

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Caracterização da miogénese fetal em ratinhos modelo da distrofia muscular laminina 211-deficiente

Ricardo dos Santos Andrade

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Sólveig Thorsteinsdóttir

Agradecimentos

Dedico este trabalho à Mariana, mãe, pai, irmã e amigos. Sem eles nada seria possível e tudo seria escusado. Uma palavra especial para a Débora, amiga que sempre me encorajou a frequentar Biologia e a apreciar os estranhos fenómenos que a realidade nos oferece.

Agradeço à Sólveig a oportunidade que me deu para desenvolver este trabalho, tal como toda a disponibilidade e ajuda que demonstrou desde o primeiro momento que mostrei interesse em frequentar o mestrado de Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento. Saúdo a Sólveig e todos os que tiveram responsabilidade na criação deste mestrado. Agradeço à Sólveig por todas as suas aulas que tive a felicidade de frequentar.

Por último, não quero agradecer ao Salmão muito menos à Sardinha, gatos velhacos que tudo fizeram para que eu não tivesse sucesso académico, desde transformar o meu rosto em pista de corrida às 3 da manhã, a ron-rons infinitos no exacto momento em que precisava de me levantar.

Abstract

Merosin-deficient congenital muscular dystrophy type 1A (MDC1A) is a neuromuscular disease in which the patient presents severe atrophy of skeletal musculature from birth, due to a mutation in the *LAMA2* gene, responsible for the production of the laminin $\alpha 2$ subunit.

Recently, it has been demonstrated with the use of *dy^W* mice that MDC1A manifests itself for the first time during fetal development, more specifically along secondary myogenesis, as evidenced by a reduction in the skeletal muscle cross sectional area (Nunes et al., 2017). This reduction was accompanied by a decrease in the number of Pax7-positive and myogenin-positive cells, without significant differences in the number of myofibers (Nunes et al., 2017). These data point to a problem in epaxial muscle growth due to an impairment in cell-mediated hypertrophy (Nunes et al., 2017). In addition, overactivation of JAK-STAT signaling pathway was observed in *dy^W* mice relative to WT mice, at 2 days and 3 weeks of age, as well as overexpression of the same pathway in cultured myofibers without the $\alpha 7\beta 1$ integrin, a major laminin 211 receptor (Nunes et al., 2017). The absence of apoptosis (Nunes et al., 2017) and the relationship between the JAK-STAT signalling pathway and the cell division symmetry through the PAR complex (Price et al., 2014; Tierney et al., 2014) resulted in the suggestion of a model in which the absence of laminin 211 is responsible for the activation of the JAK-STAT signaling pathway and that this activation alters the balance of symmetric versus asymmetric divisions of Pax7-positive cells towards an increase the asymmetric divisions at the expense of symmetric divisions, thus reducing the number of Pax7-positive cells available for secondary myogenesis (Nunes et al., 2017).

In this thesis, we set out to perform a quantitative and qualitative characterization of cell proliferation in the muscle masses and a characterization of the population dynamics of Pax7-positive cells in *dy^W* mice during secondary myogenesis. Quantitatively by counting proliferative myogenic cells, qualitatively using the immunoreaction pattern for PAR complex as an indication of symmetry versus asymmetry of these cells along secondary myogenesis.

We first asked whether there is a correct polymerization and deposition of the remaining components of the basement membrane in the formation of the Pax7-positive cell niche. For the characterization of basement membrane components along the secondary myogenesis we quantified the fluorescence intensity of immunolabeling for collagen type IV and perlecan as well as the interstitial collagen type VI, normally present in close association with the basement membrane, between the groups of *dy^W* and heterozygotes at stages E15.5, E17.5 and E18.5. However, immunolabeling for collagen type IV, VI and perlecan did not show any significant difference between *dy^W* and heterozygous mice.

For the characterization of cell proliferation and the dynamics of the Pax7-positive cell population along secondary myogenesis, we quantified the number of proliferative cells in epaxial muscle masses, through the EdU labeling using the Click-it reaction and performed immunolabeling for Pax7-positive cells, at E15.5, E17.5 and E18.5. Both quantifications were made in adjacent sections in the zone of interest of each fetus, so as to be able to, as much as possible, relate proliferation in muscle masses with the the number of Pax7-positive cells along secondary myogenesis. Quantifications of cell proliferation in epaxial muscle masses during secondary myogenesis showed a tendency for less proliferation in mutant relative to heterozygotes fetuses at E17.5, but this trend is no longer seen at the E18.5. Quantifications of the number of Pax7-positive cells along the secondary myogenesis showed that in *dy^W* fetuses there are significantly fewer Pax7- positive cells when compared to heterozygotes at E17.5, and at E18.5 this difference is accentuated. The normalization of the EdU-positive cell and Pax7-positive cell quantifications with data from the total areas of the epaxial musculature from Nunes et al., 2017 point to a greater decline in the number of Pax7-positive cells in *dy^W* relative to heterozygous mice in the these muscles between E17.5 and

E18.5. This decline may thus be related to the reduction in the proliferation rate in $dy^{W/-}$ fetuses compared to heterozygotes between E15.5 and E17.5

We also attempted to determine which of the proliferative cells in the muscles were myogenic at E17.5 using morphological criteria. However, this analysis indicated there may be a reduction in proliferation of both myogenic and non-myogenic cells.

Finally, co-immunolabeling for Pax7 and Par3 was used to assess for differences in symmetric and asymmetric divisions of Pax7-positive cells. The presence of polarized Par3 in Pax7-positive cells was used as a proxy for an asymmetric cell division. The quantifications of the Pax7 + / Par3 +, Pax7 + / Par3- and Pax7- / Par3 + patterns showed that the great majority of Pax7-positive cells in heterozygous fetuses appear to be dividing symmetrically at stage E17.5, but there were no significant differences between $dy^{W/-}$ and heterozygous mice regarding symmetric or asymmetric divisions.

Our results suggest that the smaller skeletal muscle area of $dy^{W/-}$ mice relative to heterozygotes may be due to a precocious reduction in the rate of cell proliferation at E17.5, which leads to a drastic reduction in the number of Pax7-positive cells at the end of fetal myogenesis, to the point that there are not sufficient cells to allow for the normal growth of the fetal muscles. However, further studies are necessary to verify this hypothesis.

Keywords

Fetal myogenesis, mouse, muscular dystrophy, PAX7, laminin 211

Resumo

A distrofia muscular congênita merosina-deficiente tipo 1A (MDC1A) é uma doença autossômica recessiva neuromuscular no qual o paciente apresenta, entre outros sintomas, atrofia severa da musculatura esquelética desde a nascença, devido a uma mutação no gene *LAMA2*, responsável pela produção da subunidade $\alpha 2$ da laminina.

Recentemente, foi demonstrado, com a utilização de ratinhos dy^W , um modelo para MDC1A, que a doença se manifesta pela primeira vez durante o desenvolvimento fetal, mais concretamente ao longo da miogénese secundária, visível pela observação que os fetos tem uma redução na área muscular esquelética (Nunes et al., 2017). Esta redução foi acompanhada por uma quebra do número de células Pax7-positivas e miogenina-positivas, sem diferenças significativas no número de miofibras (Nunes et al., 2017). Estes dados apontam para um problema no crescimento muscular epaxial via hipertrofia medeada por células (Nunes et al., 2017). A acrescentar a estes dados, foi observada uma sobre-ativação significativa da via de sinalização JAK-STAT em ratinhos $dy^{W/-}$ relativamente a ratinhos WT, com 2 dias e 3 semanas de idade, mas também uma sobre-ativação da mesma via em miofibras em cultura, sem a integrina $\alpha 7\beta 1$, importante receptor da laminina 211 (Nunes et al., 2017). A ausência de apoptose observada (Nunes et al., 2017) e a próxima relação entre a via JAK-STAT e a simetria de divisão celular através do PAR complex (Price et al., 2014; Tierney et al., 2014) levou à sugestão de um modelo no qual a ausência de laminina 211 é responsável pela ativação da via de sinalização JAK-STAT e que essa ativação altera o balanço das divisões simétricas *versus* divisões assimétricas das células Pax7-positivas de forma a haver um aumento nas divisões assimétricas em detrimento das divisões simétricas, reduzindo assim o número de células Pax7-positivas disponíveis para a miogénese secundária (Nunes et al., 2017).

Como tal, propusemo-nos à caracterização quantitativa e qualitativa da proliferação celular nas massas musculares e à caracterização da dinâmica da população de células Pax7-positivas em ratinhos dy^W durante a miogénese secundária. Quantitativamente pela contagem de células miogénicas proliferativas, qualitativamente utilizando o padrão de imunomarcacão para o PAR complex como indicação de simetria *versus* assimetria destas células ao longo da miogénese secundária.

No entanto primeiro, perguntámo-nos se existe uma correta polimerização e deposição de outros componentes da membrana basal muscular, nomeadamente colagénio tipo IV e perlecan, e do componente da matriz intersticial, o colagénio tipo VI, ao longo da miogénese secundária em fetos $dy^{W/-}$ comparado com fetos heterozigóticos. Para essa caracterização quantificámos a intensidade de fluorescência de imunomarcacões para colagénio tipo IV, VI e perlecan nos estádios E15.5, E17.5 e E18.5, entre os grupos de ratinhos $dy^{W/-}$ e heterozigóticos. No entanto, as imunomarcacões para colagénio tipo IV, VI e perlecan não mostraram qualquer diferença entre ratinhos $dy^{W/-}$ e heterozigóticos.

Para a caracterização da dinâmica da população de células Pax7-positivas ao longo da miogénese secundária quantificámos o número de células proliferativas em massas musculares epaxiais, através da marcação de EdU por reação Click-it, mas também à imunomarcacão de células Pax7-positivas, nos estádios E15.5, E17.5 e E18.5. As duas quantificações foram feitas a partir de cortes adjacentes na zona de interesse de cada feto, de forma a poder, tanto quanto possível, relacionar a proliferação em massas musculares epaxiais com o número de células Pax7-positivas ao longo da miogénese secundária. As quantificações da proliferação celular em massas musculares epaxiais ao longo da miogénese secundária mostraram haver uma tendência para uma menor proliferação em ratinhos $dy^{W/-}$ relativamente a heterozigóticos no estádio E17.5, sendo que essa tendência deixa de se verificar no estádio E18.5. As quantificações do número de células Pax7-positivas ao longo da miogénese secundária mostraram que em ratinhos $dy^{W/-}$ há significativamente menos células Pax7-positivas relativamente a heterozigóticos no estádio E17.5, sendo que a E18.5 essa diferença é

acentuada. A normalização das quantificações de células EdU-positivas e de células Pax7-positivas, com os dados das áreas totais da musculatura epaxial em Nunes et al., 2017 apontam para uma maior declínio do número de células Pax7-positivas em ratinhos $dy^{W/-}$ relativamente a ratinhos heterozigóticos nas três massas musculares epaxiais entre os estádios E17.5 e E18.5. Esse declínio pode estar relacionado com a redução na taxa de proliferação em fetos $dy^{W/-}$ comparado com heterozigóticos entre E15.5 e E17.5

Tentámos de seguida determinar quais das células proliferativas em massas musculares epaxiais eram miogénicas no estágio E17.5 utilizando critérios morfológicos. Estas quantificações mostraram que poderá haver uma perturbação na proliferação tanto nas células miogénicas como nas células não miogénicas.

Finalmente, foram feitas imunomarcações conjugadas de Pax7+ e Par3+, e utilizada a presença e disposição de Par3 ao longo da célula Pax7-positiva como proxy de forma a aceder a simetria de divisão destas células. As quantificações dos padrões Pax7+/Par3+, Pax7+/Par3- e Pax7-/Par3+ mostraram que a maioria das células Pax7-positivas em fetos heterozigóticos aparentam dividir-se simetricamente no estágio E17.5 e que não houve diferenças significativas da quantificação dos padrões indicativos de simetria ou assimetria entre ratinhos $dy^{W/-}$ e heterozigóticos.

Sugerimos com este trabalho, que a menor área muscular esquelética dos ratinhos $dy^{W/-}$ relativamente a heterozigóticos se deve a uma redução precoce (E17.5) na proliferação celular nas massas musculares, que poderá levar a uma redução drástica no número de células Pax7-positivas no fim da miogénese fetal, ao ponto de não haver células suficientes que possibilitem o crescimento normal da massa muscular. No entanto mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Keywords

Miogénese fetal, ratinho, distrofia muscular, PAX7, laminina 211

Índice

Agradecimentos.....	1
Abstract	3
Keywords.....	4
Resumo.....	6
Keywords.....	7
Lista de figuras	11
Lista de abreviaturas e acrónimos.....	12
Capítulo 1 Introdução.....	13
Distrofia muscular congénita merosina deficiente tipo 1A (MDC1A).....	2
Lamininas e as membranas basais	2
Miogénese	4
Laminina 211 e a membrana basal muscular.....	6
Células Pax7-positivas no feto e no adulto.....	7
Objetivos	9
Capítulo 2 Materiais e métodos	12
Animais e obtenção de fetos	13
Processamento dos fetos para criosecção	14
Genotipagem	14
Imunohistoquímica.....	15
Obtenção e análise de imagens.....	16
Quantificações	17
Análise estatística	18
Capítulo 3 Resultados	20
Resultados	21
A deposição de colagénio tipo IV, perlecan e colagénio tipo VI em redor das fibras musculares ao longo da miogénese secundária não parece afectada em fetos $dy^{w/-}$	21
A proliferação celular nas massas musculares epaxiais de fetos $dy^{w/-}$ poderá ser afectada especificamente no estágio E17.5.....	25
O número de células Pax7-positivas em presumíveis massas musculares epaxiais de fetos $dy^{w/-}$ é afectado a partir do estágio E17.5.....	25
Parece haver uma redução pontual na taxa de proliferação nas massas musculares $dy^{w/-}$ por volta do estágio de E17.5, com um efeito na população de células Pax7-positivas nesse estágio e no seguinte	28
A ausência de laminina 211 parece afetar a proliferação tanto de células miogénicas como não miogénicas nas massas musculares epaxiais de fetos $dy^{w/-}$ no estágio E17.5.....	29
A maioria das células Pax7-positivas nos fetos heterozigóticos e mutantes não têm indicação de assimetria.....	30
Capítulo 4 Discussão.....	33
O impacto das lamininas 211 na construção da membrana basal muscular	34
A ausência de laminina 211 resulta numa falha na expansão da população de células Pax7- positivas	34
Impacto da laminina 211 na proliferação em massas musculares epaxiais: Um problema	

exclusivamente miogénico?.....	36
A localização do Par-complex pode indicar o tipo de simetria das células Pax7-positivas ao longo da miogénese secundária	37
Conclusão	37
Capítulo 6 Referências	40

Lista de figuras

- Figura 1** – Estrutura e montagem da laminina 111. Pág. 3
- Figura 2** – Desenho esquemático da estrutura molecular de uma membrana basal. Pág. 4
- Figura 3** – Miogénese embrionária fetal pós-natal e em adulto. Pág. 5
- Figura 4** – Interação entre laminina 211 e integrina $\alpha 7\beta 1$. Pág. 6
- Figura 5** – Interação entre laminina 211 e distroglicanos. Pág. 7
- Figura 6** – Representação (não à escala) de uma célula satélite. Pág. 8
- Figura 7** – Representação esquemática da obtenção de fetos e o seu processamento para ensaios de proliferação via deteção de EdU e imunomarcacão. Pág. 14
- Figura 8** – Representação esquemática do ensaio experimental para as quantificações de células EdU e Pax7-positivas em cortes alternados. Pág. 16
- Figura 9** – Representação esquemática das quantificações das intensidades de fluorescência. Pág. 17
- Figura 10** – A imunomarcacão para colagénio tipo IV não revela diferenças entre músculos de fetos heterozigóticos versus $dy^{W/-}$. Pág. 22
- Figura 11** – A imunomarcacão para perlecan não revela diferenças entre músculos de fetos heterozigóticos versus $dy^{W/-}$. Pág. 23
- Figura 12** – A imunomarcacão para colagénio tipo VI não revela diferenças entre músculos de fetos heterozigóticos versus $dy^{W/-}$. Pág. 24
- Figura 13** – Existe uma tendência para uma redução na proliferação celular em fetos $dy^{W/-}$ comparado com heterozigóticos especificamente no estágio E17.5. Pág. 26
- Figura 14** – Existe uma diminuição significativa de células Pax7-positivas em massas musculares epaxiais de fetos $dy^{W/-}$ a partir do estágio E 17.5. Pág. 27
- Figura 15** – Normalização das quantificações de células Pax7-positivas e células EdU-positivas para a área total dos três músculos epaxiais. Pág. 28
- Figura 16** – A possível diminuição na proliferação celular em massas musculares epaxiais de fetos $dy^{W/-}$ comparado com heterozigóticos parece afetar tanto células miogénicas como não miogénicas. Pág. 29
- Figura 17** – Não há diferenças na presença assimétrica de Par3 em células Pax7-positivas entre fetos $dy^{W/-}$ comparado com fetos heterozigóticos. Pág. 31

Lista de abreviaturas e acrónimos

DNA – Deoxyribonucleic acid

EdU - 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

FGF – Fibroblast Growth Factor

JAK-STAT – Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription

LAMA2-CMD – Laminin α 2 Congenital Muscular Dystrophy

MDC1A – Merosin-deficient Congenital Muscular Dystrophy Type 1A

MPC – Myogenic Precursors Cells

MuSC – Muscle Stem Cell

MRF – Myogenic Regulatory Factor

PCR – Polymerase Chain Reaction

PFA - Paraformaldehyde

RT-qPCR – Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction

Shh – Sonic hedgehog

WNT – Wingless/Integrated Family Members

Capítulo 1

Introdução

Distrofia muscular congênita merosina deficiente tipo 1A (MDC1A)

A distrofia muscular congênita merosina deficiente tipo 1A (MDC1A ou LAMA2-CMD) é uma doença genética autossômica recessiva, resultante da ausência da cadeia $\alpha 2$ das lamininas 211 e 221 (antigamente conhecidas como merosinas) (Tomé et al., 1994). É responsável por 30% de todos os casos de distrofias musculares na Europa (com pequenas variações de acordo com a população em causa), tornando-a a distrofia muscular mais comum do continente europeu (Allamand & Guicheney, 2002; Gawlik & Durbeej, 2011). A MDC1A é caracterizada por fraqueza muscular associada a hipotonia muscular profunda, escoliose, cifose e a um atraso no desenvolvimento motor. Falha respiratória, dificuldades na alimentação, problemas no sistema nervoso periférico, como a lentidão na condutividade, ou sistema nervoso central, como anormalidades na massa branca e em casos raros epilepsia e disfunção ventricular, são também condições associadas, em menor ou maior escala, a um paciente com MDC1A (Gawlik & Durbeej, 2011). À parte de tratamentos paliativos no sentido de minimizar os sintomas associados, é uma doença sem cura, que impõe uma esperança média de vida relativamente curta (até a adolescência nos casos mais graves) ao seu portador, com fortes probabilidades de infecção respiratória como causa de morte (Gawlik & Durbeej, 2011).

A MDC1A é o resultado de mutações no gene *LAMA2*, responsável pela codificação da subunidade $\alpha 2$ da laminina (Tomé et al., 1994). Estas mutações podem ser substituições nucleotídicas, pequenas deleções ou inserções, que geram a produção de uma subunidade $\alpha 2$ da laminina anormal, impedindo a associação entre as três subunidades que compõem as lamininas 211 e 221. As mutações ocorrem predominantemente no terminal-N, resultando em proteínas truncadas (Suzuki et al., 2000).

Lamininas e as membranas basais

As lamininas são glicoproteínas constituídas por três polipéptidos, as subunidades α , β e γ , que se ligam entre si através de ligações dissulfeto (Fig. 1A) (Aumailley 2013; Hohenester & Yurchenco, 2013). Estruturalmente, estas três subunidades diferem pelo tamanho, número e organização de alguns domínios constitutivos. Organizam-se de forma a que a laminina tenha um formato de T ou de cruz, no qual os terminais carboxílicos se unem num só terminal que interage com receptores transmembranares e os terminais-N das três subunidades (Fig. 1A), que acabam por estar separadas interagindo com outras lamininas formando assim uma rede de lamininas (Fig. 1B) (Hohenester & Yurchenco, 2013). Até à data, são conhecidos cinco subunidades α , três subunidades β e três subunidades γ , que conjugadas em combinações diferentes, compõem as 16 isoformas de lamininas conhecidas *in vivo*. Por exemplo, a laminina 211 é composta pelas subunidades $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\gamma 1$ (Aumailley 2013; Hohenester & Yurchenco, 2013).

As lamininas são parte integrante e fundamentais para a montagem e estrutura da membrana basal, uma camada de matriz extracelular diretamente associada às células musculares, nervosas, da gordura, epiteliais e endoteliais, contribuindo para o processo de desenvolvimento, mas também manutenção dos tecidos em adulto (Yurchenco, 2011). Estas matrizes servem para proteger as células de stress físico, mas também como uma interface entre o meio e as células, com o potencial para modular a sinalização justácrina e/ou parácrina (Yurchenco, 2011). Esta sinalização parece ser globalmente mediada por integrinas, distroglicanos e interações com morfogénios (Yurchenco, 2011).

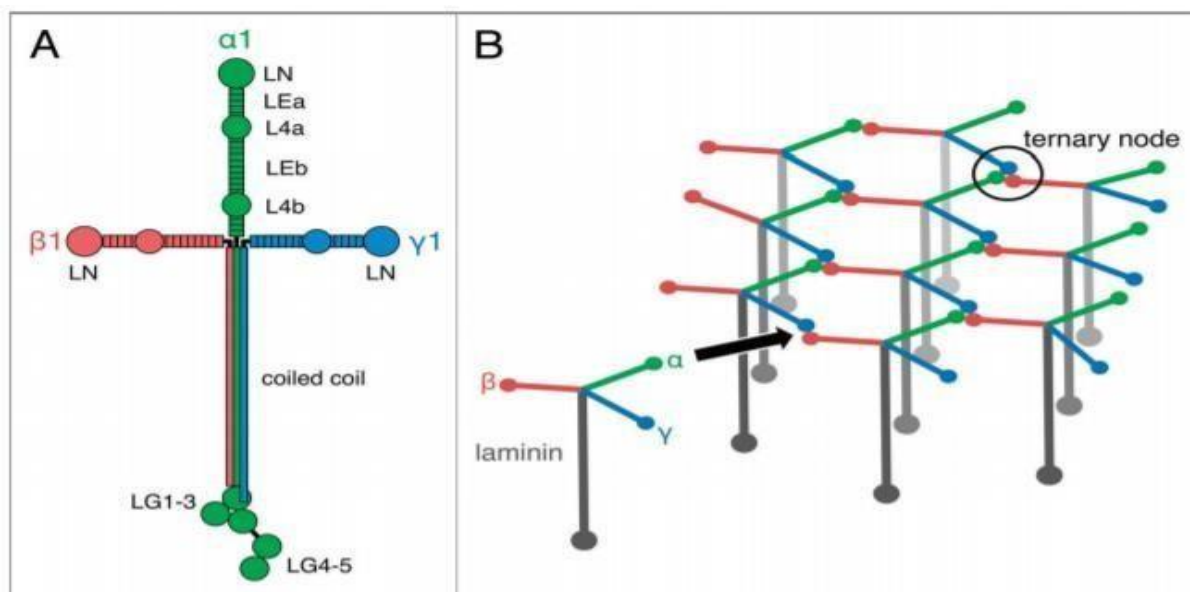


Figura 1 – Estrutura e montagem da laminina-111. (A) Desenho esquemático do heterotrímero de laminina-111. Os três braços curtos da molécula em forma de cruz têm uma estrutura de domínio comum (domínio LN). A cadeia $\alpha 1$ contém cinco domínios do tipo laminina G (LG). (B) O modelo de interação de três braços curtos na auto-montagem de uma rede de lamininas. Os nós ternários na rede são formados pelas regiões N-terminais de uma cadeia α , uma β e uma γ . O braço longo (terminais carboxílicos das três subunidades) não está envolvido na formação de redes, mas interagem com receptores na superfície celular. De Hohenester, and Yurchenco 2013.

Cada membrana basal contém pelo menos um tipo de lamininas, um ou dois de nidogénios, um proteoglicano de heparano sulfato (perlecan), um ou mais variantes de colagénio IV e, em determinadas membranas basais, também a agrina (Yurchenco, 2011; Hohenester & Yurchenco, 2013). As isoformas de laminina e colagénio têm diferenças na sua montagem, ligação a receptores transmembranares e ligações entre si, pelo que cada membrana basal varia na sua estrutura final, estabilidade e sinalização, dependendo da laminina e/ou do colagénio IV que a compõe (Yurchenco, 2011; Hohenester & Yurchenco, 2013).

Globalmente falando, a montagem da membrana basal é faseada e começa com a geração de uma rede de lamininas ancoradas a receptores transmembranares (integrinas, α -dístroglicanos e glicolípídeos sulfatados) (Yurchenco, 2011; Hohenester & Yurchenco, 2013). Interações colaterais são estabelecidas com perlecan e, em alguns casos com a agrina (Yurchenco, 2011; Hohenester & Yurchenco, 2013). Posteriormente uma rede de colagénio tipo IV é formada por cima da rede de lamininas, interagindo com esta por meio de nidogénio e estabilizada colateralmente com perlecan e agrina (Fig. 2) (Yurchenco, 2011; Hohenester & Yurchenco, 2013).

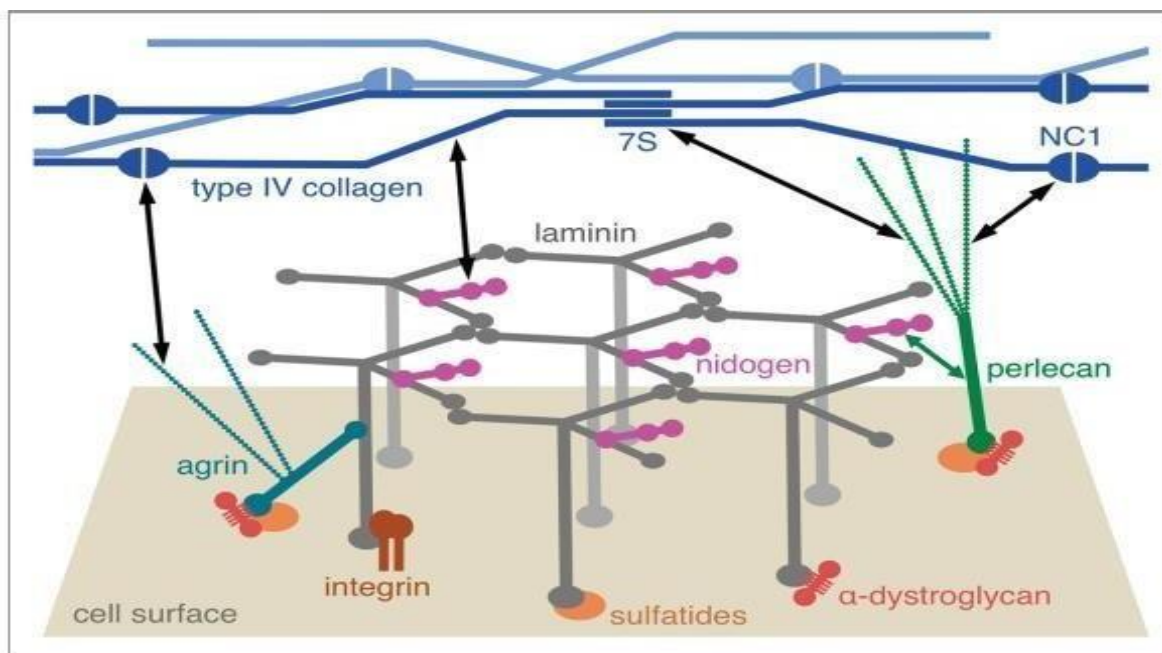


Figura 2 - Desenho esquemático da estrutura molecular de uma membrana basal. A rede de laminina é ancorada à superfície celular por interações dos braços longos com receptores celulares (integrinas, α -distroglicano e sulfatídeos). São feitas interações laterais com os proteoglicanos de heparano sulfato perlecan e agrina. Uma rede independente é formada por colágeno tipo IV, através de interações de seus domínios NC1 N-terminal 7S e C-terminal, bem como através de associações laterais das hélices triplas. As redes de laminina e colágeno estão ligadas entre si por nidogênio, perlecan e agrina. De Hohenester e Yurchenco 2013

Miogénese

O desenvolvimento da musculatura esquelética do tronco e membros começa com a formação dos sómitos, estruturas embrionárias transientes e compostos por células epitelizadas, provenientes da mesoderme pré-somítica (Pourquié, 2001; Brent & Tabin 2002).

Os sómitos são caracterizados por terem o mesmo tipo de células, com o mesmo potencial de diferenciação, mas logo após a separação da mesoderme pré-somítica começam a ser reconhecidos diferentes compartimentos dentro do sómito, pela determinação de diferentes linhagens de células (Brent & Tabin, 2002). A parte ventral sofre uma transição epitélio-mesênquima que dará origem ao esclerótomo, precursor do futuro esqueleto axial e os seus tendões. A parte dorsal do sómito continua epitelizada e é designada de dermomiótomo, que contém os progenitores miogénicos (MPCs) e também os da derme dorsal, da gordura castanha e alguns endotélis e músculo liso (Pourquié, 2001; Brent & Tabin, 2002; Kalcheim, 2015; Deries and Thorsteinsdóttir, 2016).

A miogénese começa com a indução da expressão de fatores regulatórios miogénicos (MRFs), fatores de transcrição helix-loop-helix, nas células progenitoras miogénicas. Estas células progridem para a determinação da linhagem através da expressão dos MRFs Myf5, Mrf4 e MyoD, numa primeira fase, e concluindo com o programa de diferenciação final através de miogenina e às vezes Mrf4 (Fig. 3) (Biressi et al., 2007; Buckingham & Rigby, 2017).

A indução do programa miogénico começa nas células do lábio dorso-mediano do dermamiótomo (E8.5), por sinalização de Shh expresso na notocorda, mas também pela sinalização de Wnt e Notch das células migratórias da crista neural (Rios et al., 2011; Serralbo & Marcelle, 2014; Deries & Thorsteinsdóttir, 2016). Assim, as MPC, que são células Pax3- e/ou Pax7-positivas, delaminam do lábio epaxial do dermamiótomo por transição epitélio-mesênquima e migram para a zona do futuro miótomo, onde se diferenciam em miócitos enlongados na direção antero-posterior, ou

seja, paralela ao tubo neural (Venters et al., 1999; Thorsteinsdóttir et al., 2011). A delaminação de células Pax3- e/ou Pax7-positivas para o espaço do miótomo é responsável pelo crescimento inicial do miótomo, mas pouco depois, também a região central do dermomiótomo contribui para o crescimento do miótomo libertando células Pax3- e/ou Pax7-positivas (Relaix et al., 2005; Kassar-Duchossoy et al., 2005). No entanto, nem todas as células libertadas do dermomiótomo que se translocam para a zona do miótomo contribuem para o seu crescimento. Algumas mantêm o seu grau de estaminidade intacto, e essa população de células estaminais musculares, primeiro Pax3- e/ou Pax-7 positivas, mas tarde apenas Pax7-positivas, são importantes para a miogénese primária, secundária e originam a população de células satélite no adulto (Relaix et al., 2005; Kassar-Duchossoy et al., 2005).

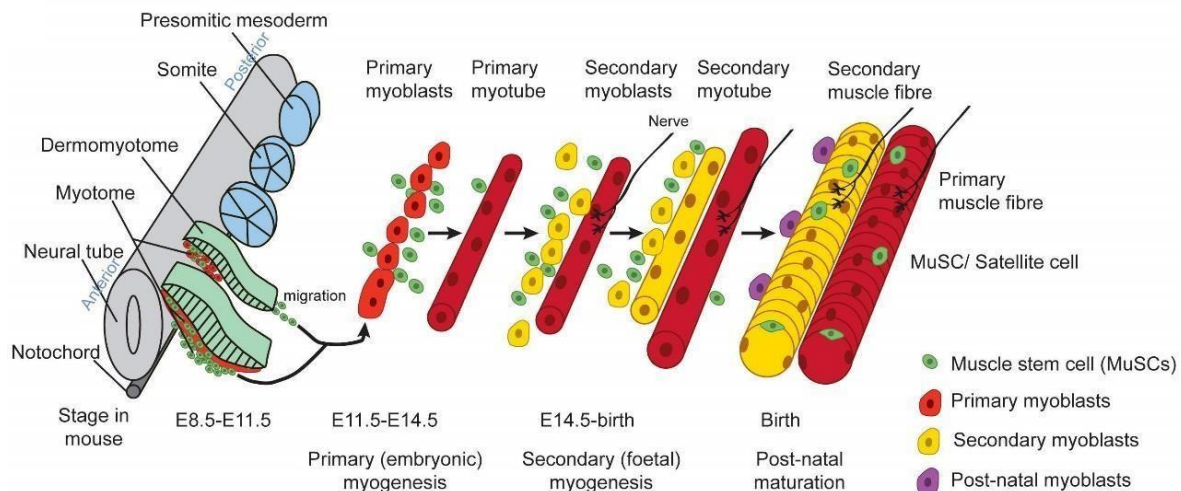


Figura 3 – Miogénese embrionária, fetal e pós-natal. O miótomo inicial (vermelho) é composto de miócitos alongados e mononucleados, que estão alinhados ao longo do eixo antero-posterior e abrangem cada compartimento somático. Durante a miogénese primária (E11.5 – E14.5), os progenitores Pax3+ e/ou Pax7+ (células estaminais mononucleadas a verde) delaminam no lado central do dermomiótomo e contribuem para a formação de grandes miofibrilas primárias (fibras a vermelho). Alguns progenitores Pax3+ também migram do lábio ventral para povoar os membros (domínio hipaxial). Durante a miogénese secundária (E14.5 - nascimento), progenitores miogénicos Pax7+ (células estaminais mononucleadas a verde) contribuem para a formação de fibras secundárias (fibras a amarelo), utilizando as fibras primárias como suporte e contribuindo para o crescimento muscular fetal. Durante esta fase, os precursores das células satélites (células estaminais mononucleadas a verde) estão localizados sob a lamina basal das fibras, onde podem ser encontrados em músculos adultos. As células estaminais miogénicas (Pax7+) contribuem para a miogénese embrionária e fetal enquanto mantêm um grupo de progenitores, que eventualmente localizam as miofibrilas maduras no nicho das células satélites. De Deries et al. (*in press*).

Depois do desenvolvimento do miótomo (E8.5 – E11.5) no tronco ocorre a miogénese primária (E11.5 – E14.5), no qual mioblastos primários resultantes da determinação miogénica de células Pax3- e/ou Pax7-positivas libertadas do dermamiótomo fundem-se com os miócitos do miótomo ou entre si, formando as miofibrilas primárias. Estas acabam por estabelecer contactos com estruturas cartilagueas, tais como vertebrae, tornando-se assim o molde no qual a miogénese continuará (Fig. 3) (Biressi et al., 2007; Tajbakhsh, 2009).

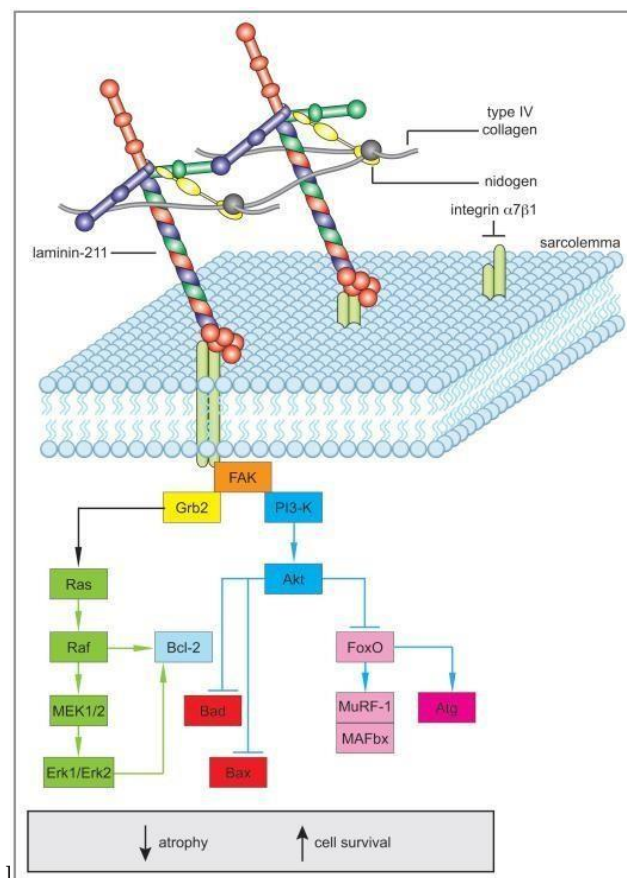
Em certos níveis axiais, o miótomo hipaxial não se forma, mas células Pax3-positivas delaminam e migram longas distâncias para formar a musculatura dos membros, língua e diafragma (Deries & Thorsteinsdóttir, 2016). Enquanto que na miogénese do tronco, os mioblastos primários se fundem entre si, mas também aos miócitos enlongados já existentes do miótomo, nos membros não há miótomo e por isso as células Pax3-positivas que migraram e se determinaram em mioblastos primários, fundem-se entre si para gerar as miofibrilas primárias (Deries et al., 2010). Eventualmente as miofibrilas primárias acabam por se anexar a estruturas cartilagueas dos membros e servirão de molde

para a restante miogénese, a par do que acontece na miogénese primária da musculatura do tronco (Deries et al., 2010; Deries & Thorsteinsdóttir, 2016).

À medida que a miogénese progride, a população de células Pax3-positivas decai, ao contrário da população de células Pax7-positivas que aumenta, tornando-se a população de células responsável por contribuir para o desenvolvimento muscular (Biressi et al., 2007; Tajbakhsh, 2009). Depois da formação das miofibras primárias, ocorre a miogénese secundária (E14.5 – E19.5) no qual grande parte do número de fibras é atingido (Biressi et al., 2007). As miofibras secundárias formam-se através de uma vaga de diferenciação de células Pax7-positivas em mioblastos secundários que se irão fundir entre si, um processo que se inicia nos pontos onde as miofibras primárias foram invadidas (Duxson et al., 1989). Para além da geração das miofibras secundárias, os mioblastos secundários também se fundem às miofibras primárias já existentes, aumentando assim o seu volume (Fig. 3) (Duxson et al., 1989; Evans et al., 1994; Duglison et al., 1999).

Laminina 211 e a membrana basal muscular

As lamininas principais constituintes da membrana basal muscular são as lamininas 211 em redor das miofibras e a laminina 221 nas junções neuromusculares (Aumailley 2013; Holmberg & Durbeej 2013). Estas interagem com distroglicano (Fig. 5) e integrina $\alpha 7 \beta 1$ (Fig. 4) (Holmberg &



ligação da laminina-211 à integrina $\alpha 7 \beta 1$ promove a ativação das vias de sobrevivência das células PI3-K / Akt e Ras / Raf / MEK / Erk (entre outras). Akt é bem conhecido por seu papel regulador crítico em numerosos processos celulares, incluindo a inibição de sinais pró-apoptóticos e pró-autofágicos como FoxO, Bad e Bax. A integrina $\alpha 7 \beta 1$ também pode ativar a via Ras, resultando em aumento da expressão de Bcl-2. Holmberg & Durbeej 2013

Durbeej 2013). O impacto que a laminina 211 pode ter está dependente com qual destes receptores transmembranares a laminina interage (Figs. 4 e 5) (Holmberg & Durbeej 2013). No caso de se ligar a integrina $\alpha 7 \beta 1$ a laminina 211 promove a activação das vias de sobrevivência celular PI3-K/Akt e Ras/Raf/Erk, entre outras (Holmberg & Durbeej 2013). A via Akt é conhecida pelo seu papel como regulador em vários processos celulares relacionados com a inibição de sinais pró-apoptóticos e pró-autofágicos, tais como FoxO, Bad ou Bax (Holmberg & Durbeej 2013). A integrina $\alpha 7 \beta 1$, se ligada a laminina 211, também pode activar a via Ras, promovendo a expressão de Bcl-2, importante regulador da morte celular (Fig. 4) (Holmberg & Durbeej, 2013).

Se por outro lado a laminina 211 interagir com o distroglicano, esta irá contribuir para a estabilização mecânica entre matriz extracelular e citosqueleto (Fig. 5), já que o distroglicano interage intracelularmente com a distrofina que por sua vez interage com filamentos de actina (Holmberg & Durbeej 2013). Fica assim garantida a interacção entre membrana basal e citosqueleto, promovendo suporte à miofibrila necessário à sua função principal que é a contração para promover a locomoção (Holmberg & Durbeej, 2013). A

ligação distroglicano-distrofina parece ser particularmente importante para as contrações musculares que exercem maior força, já que o grau de dano causado pela perda de interações entre as lamininas e o distroglicano durante uma contração/relaxamento é maior do que no caso de perda de interações entre lamininas e integrinas (Han et al. 2009; Yurchenco, 2011; Holmberg & Durbeej, 2013).

No geral, pode-se traçar um conjunto contínuo de ligações que se estendem do citoesqueleto ao distroglicano ou à membrana basal, necessários à estabilização do sarcolemma (Yurchenco, 2011). A ausência de um destes componentes resulta invariavelmente numa distrofia, da qual a MDC1A é um exemplo (Yurchenco, 2011).

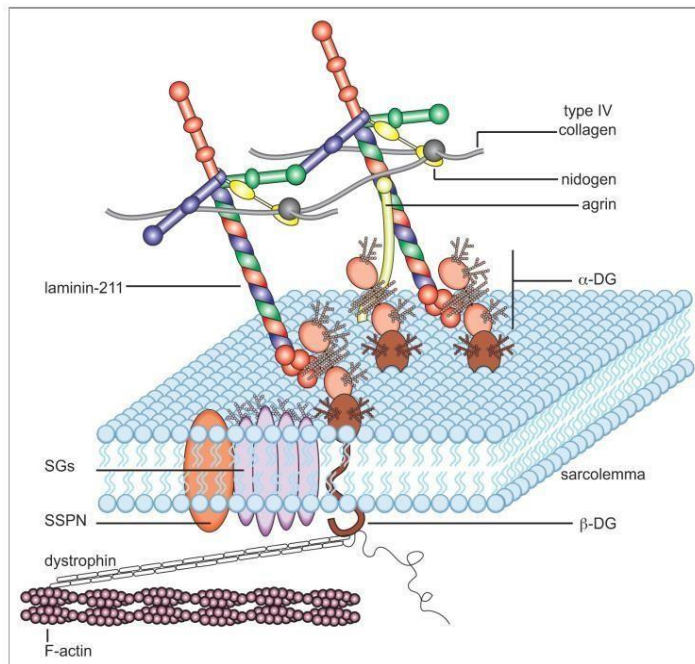


Figura 5 – Interação entre laminina 211 e distroglicanos. A laminina-211 liga-se ao distroglicano por meio de cadeias de manose ligadas em O (representadas como estruturas não-ramificadas) decorando o domínio rico em mucinas de α -distroglicano (α -DG). α -DG está ligado de forma não covalente ao β -distroglicano (β -DG), que se liga à distrofina no interior da fibra muscular. A distrofina, por sua vez, liga-se ao citoesqueleto de actina. A α -DG é estabilizado na superfície celular por meio de um SSPN e sarcoglicanos (SGs). A laminina-211 também interage diretamente com outros componentes extracelulares, tais como agrina, nidogênio e perlecan (não mostrado) e indiretamente com colágeno tipo IV. De Holmberg & Durbeej 2013

Células Pax7-positivas no feto e no adulto

À medida que as miofibras se vão formando, durante a miogénese secundária (E16.5- E18.5), com a correcta deposição da membrana basal em volta das miofibras (Nunes et al. 2017), é possível observar uma população de células precursoras miogénicas que mantém a expressão de Pax7, ou seja, mantém o seu potencial estaminal (Kassar-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005). Esta população de células é observada num nicho específico, adjacente à miofibrila e coberta (tal como a miofibrila) pela membrana basal (Kassar-Duchossoy et al., 2005; Biressi et al., 2007). Estas células são as precursoras das células satélite, células estaminais unipotentes amplamente estudadas, presentes por toda a musculatura esquelética de qualquer amniota adulto, com a mesma fisionomia, nicho e também Pax7- positivas (Kassar-Duchossoy et al.,

2005; Biressi et al., 2007). As células satélite têm como função regenerar músculo danificado e o seu estado normal é de quiescência (Chargé & Rudnicki, 2004; Dumont et al., 2015). Quando ativadas localmente na lesão, estas células tornam-se activas e recomeçam o seu ciclo celular, como que numa recapitulação da actividade das suas precursoras ao longo da miogénese secundária (Dumont et al., 2015). Por um lado, algumas células satélite diferenciam-se em mioblastos e estes prosseguem o programa miogénico e reparam o músculo danificado, por outro, outras células permanecem indiferenciadas e entram em quiescência de novo, mantendo o número da sua população para a eventualidade de uma nova lesão. Este balanço entre manutenção da população estaminal unipotente/ geração de mioblastos pensa-se ser conseguido através do equilíbrio entre divisões simétricas e assimétricas das células satélite (Kuang et al., 2008; Dumont et al., 2015). O nicho onde estas células se encontram é polarizado, ou seja, estas células são achatadas entre a miofibrila na qual são adjacentes e pela membrana basal pela qual são ladeadas (Fig. 6). Esta polarização acontece pelo perfil diferencial de ligandos dos dois lados, a miofibrila interage com este tipo de células através de M-

caderinas e Notch-Delta, entre outros, já a membrana basal interage com as células Pax7-positivas por laminina 211 e integrinas $\alpha 7 \beta 1$ e/ou distroglicano (Kuang et al., 2008; Lander et al., 2012; Dumont et al., 2015).

Interações célula-célula mediadas por caderinas e interações com matriz extracelular mediadas por integrinas são importantes na mediação da polaridade celular. Ao mudar a orientação do fuso e a polaridade da célula em relação à membrana basal, a simetria da divisão celular é definida e isso

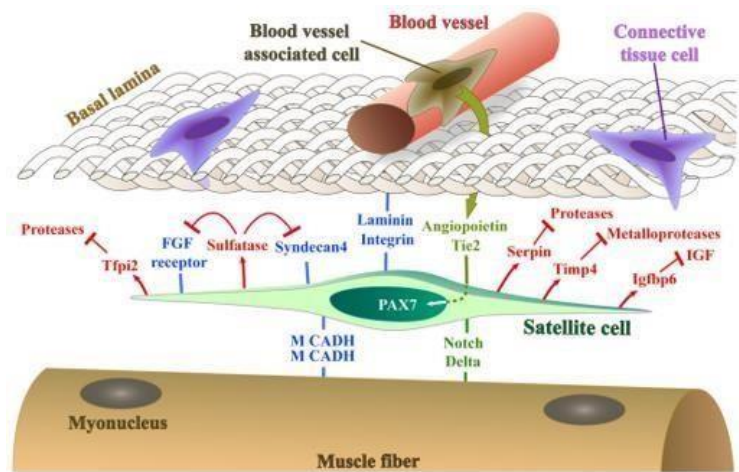


Figura 6 – Representação (não à escala) de uma célula satélite. Célula Pax7-positiva, no seu nicho junto à miofibrila muscular debaixo da lamina basal com a respectiva sinalização parácrina e justácrina polarizada. De Lander et al 2012

determinará se as duas células-filhas mantêm o seu estado indiferenciado, ou se uma delas progride para o programa de diferenciação. Se a célula se divide no plano da membrana basal e da miofibrila (divisão simétrica), são geradas duas células filhas idênticas que contactam tanto a membrana basal como a miofibrila. No entanto, se a célula se dividir apico-basalmente (divisão assimétrica), uma das células filhas permanece em contacto com a membrana basal e continua estaminal, e a outra, em contacto com a fibra, diferencia (Rudnicki et al., 2008).

A MDC1A *in utero*

A linha dy^W de ratinho (Kuang et al., 1998) é muito usada como modelo para MDC1A humana (<https://www.curecmd.org/resources-for-scientists>). A caracterização, em ratinhos $dy^{W/+}$ vs $dy^{W/-}$, do desenvolvimento do miótomo através da sua área, da miogénese primária através do número de miofibras primárias e da presença das diferentes lamininas ao longo dos dois processos revelou que não existem desequilíbrios no normal desenvolvimento muscular durante estas fases mais precoces (Nunes et al., 2017). Contudo, ao longo da miogénese secundária, foi observado uma perturbação no crescimento muscular em ratinhos $dy^{W/-}$ relativamente a ratinhos $dy^{W/+}$ evidenciado tanto pela diferença da área da musculatura epaxial, como na diferença do número de células Pax7-positivas e Miogenina-positivas, demonstrando que a MDC1A neste modelo manifesta-se pela primeira vez *in utero*, mais concretamente entre os estádios E17.5 e E18.5 (Nunes et al., 2017). Por outro lado, não foi observada uma diferença significativa do número de miofibras entre ratinhos $dy^{W/+}$ vs $dy^{W/-}$ nos estádios onde foi detectada a diferença na área do músculo, pelo que o menor crescimento da musculatura epaxial em $dy^{W/-}$ coincide com um menor número de células Pax7-positivas e Miogenina-positivas (Nunes et al., 2017). Também foi feita uma análise por RT-qPCR da expressão génica de proteínas alvo relacionadas com as vias de sinalização Notch, Wnt e JAK-STAT, conhecidas pelo seu papel de moduladoras do desenvolvimento muscular, foi observado em ratinhos $dy^{W/-}$ uma maior expressão de genes alvo da via de sinalização JAK-STAT em ratinhos $dy^{W/-}$ no estádio E17.5 (Nunes et al., 2017).

O intenso crescimento muscular da miogénese fetal pode ser alcançado por dois processos principais (1) formação *de novo* de miofibras secundárias (hiperplasia), a maioria das quais ocorre até E18.0 e (2) através do crescimento dessas miofibras secundárias, e das miofibras primárias preexistentes, através de fusão de mioblastos a essas fibras (hipertrofia mediada por células) (Ontell &

Kozeka, 1984; Biressi et al., 2007; Tajbakhsh, 2009). Foi demonstrado que apesar da área muscular epaxial menor de $dy^{W/-}$ em comparação com $dy^{W+/+}$, o número de miofibras não é significativamente distinto, sugerindo um problema na hipertrofia mediada por células (Nunes et al., 2017). A queda do número de células Pax7- e Miogenina-positivas entre E17.5 e E18.5 corrobora a sugestão de que o problema reside na hipertrofia mediada por células (Nunes et al., 2017).

Um estudo recente indica que a sinalização STAT3 promove a diferenciação miogênica de células satélites, inibindo assim a expansão da população de células satélite durante a reparação do músculo esquelético (Tierney et al., 2014). A escolha da auto-renovação ou diferenciação deve ser bem regulada, a fim de manter simultaneamente um importante pool de células satélite e gerar diferenciação miogênica para reparo muscular em caso de lesão, (Tierney et al., 2014). Isto indica a necessidade de um sistema de regulação molecular, no qual a ativação e inibição da via de sinalização JAK-STAT, poderá regular o balanço entre a diferenciação celular para reparação muscular e a manutenção de uma população indiferenciada de células de auto-renovação (Tierney et al., 2014). Os resultados encontrados em Tierney et al. 2014 indicam a via de sinalização JAK-STAT como sendo um possível interveniente dessa regulação molecular.

Outro estudo recente sugere que ativação da sinalização JAK-STAT em células satélite inibe a sua capacidade de expansão simétrica, que mantém o estado indiferenciado e de auto-renovação (Price et al., 2014). O PAR complex é um complexo multi-proteico relacionado à polaridade, crucial para a integração da sinalização de Wnt e Notch na regulação de divisões assimétricas de células satélite e também está presente na ativação de aPKC e STAT3 em células estaminais de cancro da mama (McCaffrey et al., 2012). Desta forma, é sugerido que a via de sinalização JAK-STAT medeia a regulação do PAR complex (Price et al., 2014).

O nicho das células Pax7-positivas, em contacto com a miofibrila e a membrana basal, favorece as divisões simétricas e, conseqüentemente, a manutenção da população de células satélite (Dumont et al., 2015). Num cenário de divisão assimétrica, uma célula-filha mantém a sua estaminalidade e a outra diferencia e funde-se com a fibra muscular (Price & Rudnicki, 2013). Assim, é possível que a deficiência de laminina 211 altere a natureza do nicho das células satélite (Nunes et al., 2017).

Tendo em conta que foi observado em culturas de miotubos $\alpha 7$ -null uma forte sobreativação da via de sinalização JAK-STAT e que não foi observado um aumento de apoptose na população de células Pax7-positivas entre E17.5 e E18.5, é sugerido em Nunes et al., 2017 um modelo no qual a ausência de laminina 211 é responsável pela ativação da via de sinalização JAK-STAT e que a sobre-ativação desta via desloca o equilíbrio das divisões simétricas versus assimétricas das células Pax7-positivas para um aumento relativo das divisões assimétricas, originando um número de células Pax7-positivas disponíveis para a miogênese secundária abaixo do que seria esperado nesse intervalo de tempo do desenvolvimento muscular. Assim, segundo esta hipótese, em vez de manter um determinado nível de aumento da população de células Pax7-positivas através de divisões simétricas, há um aumento nas divisões assimétricas e a população de células Pax7-positivas não cresce ao ritmo necessário para suportar o crescimento muscular fetal (Nunes et al., 2017).

Objetivos

Tendo em conta que a correta polarização e deposição de uma rede de lamininas é fundamental para os restantes passos da formação da membrana basal, a ausência de laminina 211 em ratinhos $dy^{W/-}$ poderá afetar a deposição de outros componentes da membrana basal. Durante o desenvolvimento fetal, os ratinhos $dy^{W/-}$ depositam laminina 511 e 411 a volta das fibras musculares, mas essas duas lamininas poderão não ser suficientes para assegurar a normal deposição da

membrana basal. Propomo-nos assim a caracterizar dois componentes da membrana basal, colagénio IV e perlecan, bem como colagénio VI, um colagénio que se organiza em grande proximidade da membrana basal, em fetos heterozigóticos e $dy^{W/-}$ de forma a perceber se a ausência de laminina 211 observado nos mutantes influencia a deposição destas moléculas.

Propomo-nos também a realizar uma caracterização quantitativa e qualitativa da proliferação celular nas massas musculares e a dinâmica da população de células Pax7-positivas em ratinhos dy^W durante a miogénese secundária. Quantitativamente pela contagem de células miogénicas proliferativas, qualitativamente utilizando o padrão de imunomarcção para o PAR complex como indicação de simetria versus assimetria destas células ao longo da miogénese secundária. Desta forma pretendemos aceder às dinâmicas que estão por trás da manutenção da população de células Pax7- positivas no desenvolvimento da musculatura esquelética epaxial em fetos $dy^{W/-}$ e assim compreender melhor o início da MDC1A.

Capítulo 2

Materiais e métodos

Animais e obtenção de fetos

O modelo biológico utilizado neste trabalho foi o ratinho (*Mus musculus*), linhagem dy^W (Kuang et al., 1998). A criação desta linhagem passou pela inserção de uma cassete *LacZ-neo* no gene *Lama2*, levando a que ratinhos dy^W homozigóticos para essa inserção ($dy^{W/-}$) produzam, em pequenas quantidades, uma versão da proteína laminina $\alpha 2$ truncada no seu domínio terminal-N (domínio LN). Assim, a produção das merosinas (lamininas-221 e 211) não é possível nestes animais, possibilitando a simulação da distrofia muscular merosina deficiente tipo 1A (MDC1A) (Kuang et al., 1998). Ratinhos dy^W heterozigóticos foram cruzados para obter ninhadas de fetos selvagens (*wild-type* ou $dy^{W+/+}$), heterozigóticos ($dy^{W+/-}$) e homozigóticos ($dy^{W/-}$) para a inserção, a uma frequência Mendeliana (em média as ninhadas são 25% $dy^{W+/+}$, 50% $dy^{W+/-}$, 25% $dy^{W/-}$). Tendo sido previamente testada a semelhança entre ratinhos dy^W heterozigóticos e *wild-type*, foram utilizados os primeiros por uma questão de conveniência.

O estágio de desenvolvimento das ninhadas foi calculado através da observação de rolhões de cópula, estruturas brancas e gelatinosas, depositadas pelo macho, na vagina da fêmea, findo o coito. Os indivíduos (um macho e duas fêmeas) foram juntos nos fins de tarde e na manhã a seguir, a possível observação de um rolhão vaginal marcaria o estágio E0.5. Tanto as fêmeas com rolhão como as restantes foram isoladas dos machos e após um período de observação de 10 dias, período pelo qual se tornava possível a observação de pretuberâncias laterais na zona abdominal da fêmea, indicando a presença de gravidez. Confirmada a gravidez as fêmeas foram postas de parte até ao estágio de interesse.

Nos dias em que as ninhadas atingiram os estádios de desenvolvimento de interesse (E15.5, E17.5 e E18.5), as fêmeas grávidas foram anestesiadas pela inalação de isoflurano (2-chloro-2-(difluoromethoxy)-1,1,1-trifluoro-ethane, IsoFlu) e após confirmado o seu estado de inconsciência por ausência de reflexos em resposta a contacto físico nas patas, sacrificadas por deslocação cervical. O útero de cada fêmea foi removido e imediatamente colocado em PBS (*phosphate buffered saline*) completo (com Ca^{2+} e Mg^{2+}) previamente arrefecido em gelo. Os fetos foram dissecados do útero e de seguida decapitados. A cauda foi recolhida para posterior genotipagem e os fetos foram fixados em 2% paraformaldeído em PBS (ver **Processamento dos embriões para criosecção**). Todos os procedimentos envolvendo ratinhos foram realizados segundo protocolos aprovados (ref^a 3/2016 e 2/2018) pelo Orgão Responsável pelo Bem-Estar dos Animais (ORBEA) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

As quantificações de proliferação celular nas massas musculares foram conseguidas através da incorporação de EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) fornecido no Click-iT[™] EdU Alexa Fluor[™] 647 Imaging kit (C10340, Invitrogen). EdU é um nucleósido sintético análogo da timidina, utilizado pelas células na fase S (Salic and Mitchison, 2008). Para o efeito, foi necessário injectar 10 μ g de EdU por cada grama de peso da fêmea grávida na sua cavidade peritoneal, 12 e 4 horas antes do sacrifício, de forma a que o nucleósido sintético fosse absorvido para a corrente sanguínea da fêmea, transportado através da mesma via a placenta e assim entrar em contacto com as células dos fetos em desenvolvimento. Ao injectar EdU 12 horas antes do sacrifício, todas as células na fase S, nesse intervalo de tempo, vão ser EdU-positivas e assim é tido em conta a duração da fase S (entre 6 a 8 horas). A injeção 4 horas antes tem como objectivo evitar a diluição do sinal EdU em células que se dividem rapidamente, ou seja, certificar que as últimas células em fase S antes do sacrifício sejam também claramente EdU-positivas. O útero das fêmeas de ratinho é bilobado e lateralizado ao longo do abdómen, pelo que a injeção deve ser dada na zona abdominal superior central e a agulha introduzida de cima para baixo, garantindo, por um lado, a correcta deposição da solução na cavidade peritoneal e por outro não danificar nenhum feto com a agulha.

Processamento dos fetos para criosecção

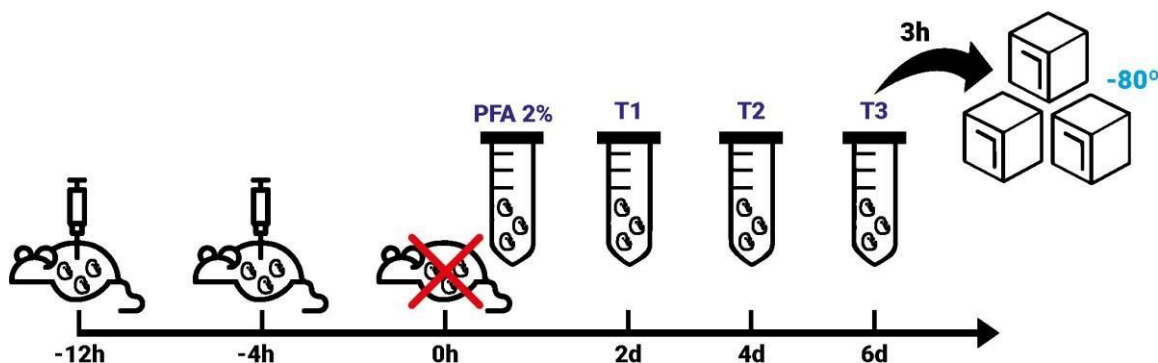


Figura 7 – Representação esquemática da obtenção de fetos e o seu processamento para ensaios de proliferação via detecção de EdU e imunomarcação. A fêmea *dy^W* grávida é injectada com 10 µg de EdU por cada grama do seu peso na cavidade peritoneal, 12 e 4 horas antes do seu sacrifício. Após o sacrifício da fêmea, os fetos são recolhidos e fixados em 2% PFA em tampão fosfato. Ao fim do período de fixação, os fetos são incubados em T1, T2 e T3 sucessivamente, montados em T3, congelados em contacto com isopentano arrefecido em gelo seco e posteriormente armazenados a -80°C. PFA 2%="2% paraformaldeído em tampão fosfato"; T=tampão.

O processamento dos fetos para criosecção é ilustrada na Figura 7. Depois da decapitação os fetos foram fixados durante 48 horas em 2% paraformaldeído (PFA; VWR) em 0.12M tampão fosfato com 4% de sacarose (VWR) e posteriormente lavados em tampão fosfato com um gradiente de sacarose (Bajanca et al., 2004), primeiro em T1 (0.12M tampão fosfato com 4% de sacarose) durante 12h e depois em T2 (0.12M tampão fosfato com 15% de sacarose) durante 12h. Por fim, os fetos foram incubados em T3 (0.12M tampão fosfato com 15% de sacarose e 7.5% de gelatina, Sigma G2500) durante 3 horas a 37°C e, de seguida, cuidadosamente imersos em T3 à 37°C num barco de alumínio e mantidos à temperatura ambiente para a sua solidificação. Houve o cuidado de manter o feto numa posição que permita cortes transversais (ou longitudinais se for o caso disso) aquando da sua solidificação. A orientação posicional do feto foi marcada em cima do T3 solidificado à temperatura ambiente. Os barcos foram então postos a flutuar em isopentano líquido, previamente arrefecido em gelo seco (CO₂ no estado sólido), até estarem congelados e imediatamente armazenados a -80°C (Bajanca et al., 2004). É garantido um congelamento homogéneo entre o feto e o T3, já que o feto passou pelo processo de imersão num gradiente de sacarose com gelatina na última solução, garantindo uma correcta impregnação da gelatina nos tecidos fixados.

Genotipagem

Os fetos resultantes dos cruzamentos entre heterozigóticos *dy^W* foram genotipados. Para o isolamento de DNA a partir das caudas dos fetos, estas foram primeiramente digeridas em proteinase K (pK) com uma concentração final de 2mg/ml em 250 µl de tampão lise (25ml Tris 1M pH = 9.5, 2ml EDTA 0.5M pH = 8.0, 0.1ml NaCl 5M, 0.1 ml SDS 10%, 19.15 ml H₂O) por cada cauda, durante toda a noite a 55°C e posteriormente centrifugado durante 1 hora a 14000 rpm (rotações por minuto). A porção viscosa do produto resultante foi removida e à porção líquida foi acrescentada 250µl de isopropanol durante 2 horas a -20°C para precipitar o DNA presente. O DNA precipitado foi então centrifugado durante 25 minutos a 13000 rpm a 4°C e eliminado o sobrenadante por inversão. Ao *pellet* resultante foi adicionado 1 ml de etanol 100%, o eppendorf invertido várias vezes e posteriormente centrifugado durante 40 minutos a 13000 rpm a 4°C. A mesma centrifugação foi feita

mais duas vezes mudando o etanol, desta vez a 70%. Depois de retirado do etanol, o *pellet* resultante foi deixado a secar e posteriormente dissolvido em 20 µl de TE a 55°C durante 10 minutos. O produto resultante foi guardado a -20°C.

Depois da extracção e isolamento do DNA foi feita uma reacção de PCR (*polymerase chain reaction*). A 20 µl de PCR *master mix* Promega foram juntos, 0.5 µl de cada primer (dyWF1, dyWR2) e 2 µl de DNA previamente extraído de cada cauda dos fetos utilizados. O programa do PCR passou por um primeiro ciclo de 5 minutos a 95°C, um segundo ciclo de 30 minutos a 95°C, 35 ciclos de 30 minutos a 60.6°C, um ciclo de 45 minutos a 72°C, um último de 10 minutos a 72°C e finalmente mantido o produto do PCR a 4°C. Foram usados os seguintes primers: 5' ACTGCCCTTTCTCACCACCCCTT 3' (dyWF1), 5' GTTGATGCGCTTGGGACTG 3' e 5' GTCGACGACGACAGTACTGGCCTCAG 3' (dyWR2; **Annex I – P1**).

Por fim os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de 1% agarose em 50 ml TBE com 2µl de Greensave (Nzytech). As amostras foram pipetadas nos poços do gel e a eletroforese correu durante 30 minutos a 110 V.

Imunohistoquímica

Os fetos previamente armazenados e congelados a -80°C foram cortados transversalmente ao nível do coração num criostato Leica CM1860, produzindo cortes com uma espessura de 12 µm. Os cortes foram colectados em lâminas Super Frost (Thermo Scientific) e deixados a secar durante 30 minutos a 1 hora.

Findo o período de secagem, os cortes foram lavados três vezes com PBS 1x (PBS sem Ca²⁺ e Mg²⁺) durante 10 minutos. De seguida os cortes foram permeabilizados com 0.2% de Triton X-100 (Sigma) em PBS 1x durante 20 minutos (para a marcação dos componentes da matriz extracelular, colagénio tipos IV, VI e perlecan), ou 0.5% Triton X-100 em PBS 1x durante 30 minutos (para o ensaio da proliferação e imunomarcação para Pax7).

Posteriormente à permeabilização foram feitas três lavagens em PBS 1x de 10 minutos cada e os cortes destinados à marcação para Pax7 foram submetidos a um processo de *antigen retrieval* em 10 mM Tris base com 1 mM EDTA, 0.05% Tween, pH 9.0 durante 20 minutos a 95°C.

Um dos objectivos iniciais deste trabalho foi co-localizar Pax7 e EdU nos mesmos cortes, para poder determinar a taxa de proliferação das células Pax7-positivas (Pax7+). No entanto, ensaios experimentais vieram confirmar que quando submetidos à *antigen retrieval* a 95°C, independentemente do tempo utilizado (5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos), o EdU deixava de ser detetável através do kit Click-iT[™] EdU Alexa Fluor[™] 647, pelo que houve a necessidade de uma outra abordagem experimental. Assim, em detrimento da co-localização de marcações foi utilizada a adjacência de cortes como esquematizado na Figura 8. Os cortes do mesmo feto destinados à detecção EdU e à marcação para Pax7 foram distribuídos equitativamente entre duas lâminas, garantindo assim que tanto as contagens de proliferação como as de células Pax7+ foram realizadas em cortes adjacentes.

Os anticorpos utilizados nas imunomarcações são provenientes ora de ratinho, ora de coelho. A utilização de anticorpos de ratinho em fetos de ratinho gera marcação indesejada, porque o anticorpo secundário utilizado também reconhece imunoglobulinas G (IgGs) do próprio feto. Como tal, a solução

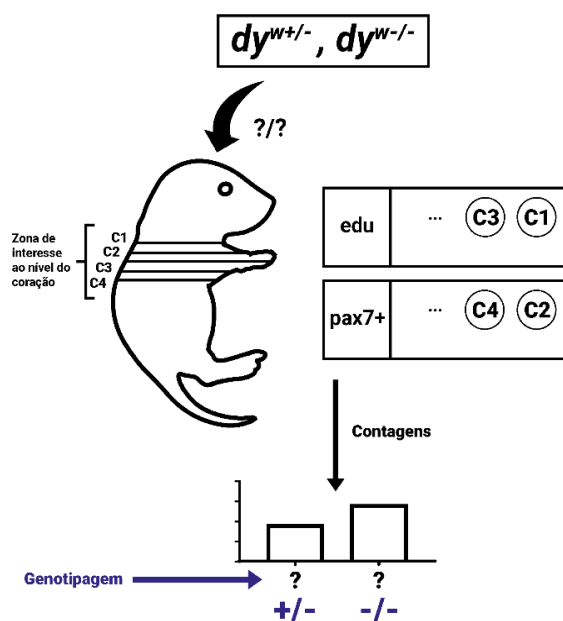


Figura 8 – Representação esquemática do ensaio experimental para as quantificações de células EdU e Pax7-positivas em cortes alternados. Cortes de criostato transversais ao nível do coração com espessura de 12 μ m e de dois fetos, cuja genotipagem é desconhecida pelo autor, mas com a certeza de que um é heterozigótico e outro mutante, são colocados em lâminas SuperFrost pela ordem revelada pela numeração na figura. Esse método garante que todas as lâminas tenham cortes adjacentes (ou quase adjacentes) de todos os níveis do feto amostrado. De seguida, as lâminas são processadas de forma a que as visualizações em separado de EdU e Pax7+ sejam feitas em cortes adjacentes (ou quase adjacentes) do mesmo feto. Posteriormente às contagens e análise estatística, é revelada ao autor a genotipagem de cada feto.

IgG Blocking do mouse-on-mouse (M.O.M.) Kit (Vector laboratories Inc.) foi posta em cima dos cortes e os cortes incubados nessa solução durante 1 hora à temperatura ambiente. Terminado este tempo e depois da solução IgG Blocking removida, os cortes foram incubados durante 10 minutos em concentrado proteico, também do M.O.M. Kit. Por fim foram administrados os anticorpos primários (listados na Tabela 1) diluídos no concentrado proteico. Os cortes foram incubados em anticorpo primário a 4°C durante a noite.

Findo o período de incubação do anticorpo primário, os cortes foram lavados três vezes 10 minutos com PBS 1x e de seguida foram aplicados os anticorpos secundários (listados na Tabela 1) diluídos no concentrado proteico do M.O.M. Kit e incubados durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram então lavados três vezes com PBS 4x (i.e. 4x concentrado) durante 15 minutos cada. Os cortes endereçados à detecção EdU foram incubados durante meia hora com a solução Click-it (Anexo 1. Posteriormente a este passo os cortes foram lavados duas vezes com PBS 1x. Todos os cortes foram então pós-fixados durante 30 minutos com PFA a 2% em PBS 1x, incubados durante 30 segundos com 5 μ g/ml 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em PBS 1x e lavados em PBS 1x. As lâminas com os cortes foram de seguida montadas em 50 mg/ml propilgalato em PBS:glicerol (1:9) e selados com verniz.

Obtenção e análise de imagens

Os resultados das experiências de imunohistoquímica foram observados num microscópio confocal Leica SPE ou num microscópio de fluorescência Olympus BX60. Imagens da análise da proliferação celular foram obtidas no Leica SPE utilizando uma objetiva HC PL APO 20x/0.70 CS e imagens do mesmo corte foram juntos através da aplicação de uma ferramenta de *stitching* automático do software Leica LAS X Core. As imagens das restantes experiências de imunohistoquímicas (para a detecção de Pax7 e Par3) foram adquiridas com uma câmara digital monocromática CCD Hamamatsu Orca R2 (1.3 Mpixel) acoplada a um microscópio de fluorescência Olympus BX60. No caso das

imagens da marcação para Pax7 e a matriz extracelular foi utilizada uma objetiva UPlanApo 10x, já para a marcação para Pax7 e Par3 foi utilizado uma objetiva de UPlanApo 60x.

Todas as imagens foram analisadas no Fiji 1.51 (<https://fiji.sc/>). Foi utilizada a ferramenta *analyse/measure* com a opção para área (em μm^2) e *mean gray value* (média dos cinzentos de todos os pixels de uma dada área seleccionada) e o *cell counter* (http://fiji.sc/Cell_Counter). Os painéis de imagens foram conseguidas com a utilização do Adobe Illustrator versão CC (17).

Quantificações

As quantificações de células proliferativas num intervalo de tempo de 12 horas (EdU-positivas)

e de células Pax7-positivas foram obtidas medindo primeiro a área (área de interesse manualmente seleccionada utilizando a ferramenta lasso e diretamente medido em Fiji 1.51) de três massas musculares epaxiais, nomeadamente *transversospinalis*, *longissimus* e *iliocostalis* e contando os núcleos positivos para EdU ou Pax7 dentro dessas massas. No fim, foi feita a divisão número de núcleos por área. Como todas as células que proliferam e que expressam Pax7 são uninucleadas, obtem-se assim o valor de número de células EdU- ou Pax7-positivas/ μm^2 . Cada uma dessas quantificações foi feita em 6 imagens (cada imagem corresponde a um corte) por feto (6 para EdU e 6 para Pax7) e a média de cada conjunto de 6 imagens foi o valor utilizado na análise estatística (n=3 fetos por genótipo, por estágio).

A quantificação da intensidade de fluorescência nos cortes imunomarcados para colagénio tipo IV, VI e perlecan foi obtida de acordo com o método esquematizado na Figura 9. Utilizando sempre a mesma área foi medido o valor médio na escala de cinzento (*mean gray scale*) em diferentes pontos das três massas musculares epaxiais (i.e. *transversospinalis*, *longissimus* e *iliocostalis*). Calculada a média dos valores de cinzento dos diferentes pontos nas massas musculares, foi dividido pelo valor médio na escala de cinzento do tubo neural, que não tem marcação específica para as moléculas em estudo, do mesmo corte. Esse valor representa o ruído de fundo do corte. Assim é conseguido um valor normalizado de intensidade de fluorescência de cada corte. Foram obtidas 6 imagens para cada feto e a média de cada conjunto de 6 imagens foi utilizada na análise estatística (n=3 fetos por genótipo, por estágio). É importante que a área com que se obtem o valor na escala de cinzento seja anatomicamente sempre a mesma e que a amostragem ao longo das massas musculares epaxiais seja distribuído de forma a ser representativa.

Nas experiências de imunohistoquímica dupla para Pax7 e Par3 foi feita uma quantificação total das seguintes situações: células Pax7-positivas e Par3-positivas (Pax7+/Par3+), células Pax7-

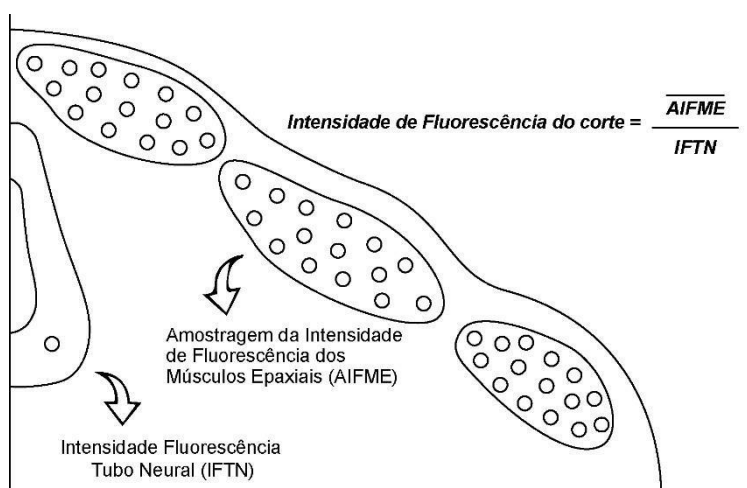


Figura 9 – Representação esquemática das quantificações das intensidades de fluorescência. É obtida a média da intensidade de fluorescência medida numa escala de cinzento (mean grey scale no menu measure do ImageJ) e sempre com a mesma área ($500 \mu\text{m}^2$), em 15 zonas distribuídas por cada uma das três massas musculares (transversospinalis, longissimus e iliocostalis). De seguida, é feita a média dessa amostragem por corte e essa média é dividida com a intensidade de fluorescência medida numa escala de cinzento, de uma área de igual tamanho ($500 \mu\text{m}^2$) no tubo neural do mesmo corte. O tubo neural não tem marcação específica para os antígenos estudados e consequentemente esse valor é o valor do ruído de fundo. Fica assim estabelecido um valor a que chamamos “intensidade de fluorescência” da imunomarkação nas massas musculares desse corte. Foram obtidas as medições de intensidade de fluorescência de 6 cortes por feto e a média de cada feto foi utilizado para a análise estatística.

positivas e Par3-negativas (Pax7+/Par3-) e células Pax7-negativas e Par3-positivas (Pax7-/Par3+). Essa quantificação foi realizada em 6 imagens (cada imagem corresponde a um corte) tiradas ao longo das três massas musculares epaxiais, *transversoespinalis*, *longíssimus* e *iliocostalis* em cada feto (n=3 fetos por genótipo).

Análise estatística

A configuração experimental obedeceu a um procedimento tipo “blinded”, ou seja, os fetos foram-me disponibilizados em pares, um heterozigótico e um mutante, mas sem eu saber qual dos dois era qual. No fim da análise e/ou das contagens foi-me revelada a genotipagem dos indivíduos. A análise estatística das quantificações feitas neste trabalho, foi um Student’s t test e foi realizada no GraphPad Prism 7 e Excel 2016.

Capítulo 3

Resultados

Resultados

A deposição de colagénio tipo IV, perlecan e colagénio tipo VI em redor das fibras musculares ao longo da miogénese secundária não parece afectada em fetos $dy^{W/-}$

A membrana basal tem vários componentes e a sua construção ao longo do desenvolvimento obedece a uma ordem que envolve, entre outros, a correcta deposição de colagénio tipo IV e perlecan (Carmignac & Durbeej, 2012; Hohenester & Yurchenco, 2013). Tendo em conta que a deposição, polimerização e estabilização da rede de colagénio tipo IV está dependente, entre outros factores, da correcta deposição e polimerização da rede de lamininas ancoradas (Carmignac & Durbeej, 2012; Hohenester & Yurchenco, 2013), questionou-se se o padrão ou a quantidade da rede de colagénio tipo IV da membrana basal das fibras musculares e/ou a volta de células miogénicas mononucleadas em fetos de ratinho $dy^{W/-}$, poderia estar afectada de alguma forma relativamente a fetos heterozigóticos. Imunomarcagem para o colagénio tipo IV em cortes transversais de fetos $dy^{W/+}$ e $dy^{W/-}$ nos estádios E15.5, E17.5 e E18.5, não revelou diferenças no padrão de distribuição do colagénio tipo IV entre os dois genótipos (comparar Figuras 10A e B, C e D, E e F). A medição da intensidade de fluorescência para colagénio IV em áreas definidas das massas musculares (ver Materiais e Métodos) também não revelou diferenças entre fetos heterozigóticos e $dy^{W/-}$ nos estádios estudados (Figura 10G-I).

Outro componente da membrana basal, o perlecan, é um proteoglicano responsável pela estabilização da rede de colagénio tipo IV, mas também pelo reforço da rede de lamininas, através da sua interacção com nidogen. O perlecan tem cadeias de heparano sulfato que têm uma grande afinidade com FGF's (Hohenester & Yurchenco, 2013). Consequentemente, uma alteração na deposição de perlecan pode levar a alterações ao nível de sinalização FGF (Sarrazin et al., 2011; Balasubramanian & Zhang, 2016). Por isto, questionou-se se um ratinho $dy^{W/-}$ poderia ter uma deposição de perlecan alterada nas membranas basais das presumíveis massas musculares epaxiais. Imunomarcagem para perlecan em cortes transversais de fetos heterozigóticos e $dy^{W/-}$ nos estádios E15.5, E17.5 e E18.5, não revelou diferenças no padrão de distribuição de perlecan entre os dois genótipos (comparar Figuras 11A e B, C e D, E e F). A medição da intensidade de fluorescência para perlecan em áreas definidas das massas musculares (ver Materiais e Métodos) também não revelou diferenças entre fetos $dy^{W/+}$ e $dy^{W/-}$ nos estádios estudados (Figura 11G-I).

Por fim, estão documentadas outras distrofias musculares, como por exemplo a distrofia muscular congénita de Ulrich, causadas por um defeito na expressão de colagénio tipo VI (Lampe & Bushby, 2005), que normalmente está associado à membrana basal (Lampe & Bushby, 2005), o que levou a questionar se também num cenário de desequilíbrio da rede de lamininas, também o colagénio tipo VI poderia sair afectado em fetos $dy^{W/-}$. Imunomarcagem para o colagénio tipo VI em cortes transversais de fetos heterozigóticos e $dy^{W/-}$ nos estádios E15.5, E17.5 e E18.5, não revelou diferenças no padrão de distribuição de colagénio tipo VI entre os dois genótipos (comparar Figuras 12A e B, C e D, E e F). A medição da intensidade de fluorescência para colagénio tipo VI em áreas definidas das massas musculares (ver Materiais e Métodos) também não revelou diferenças entre fetos heterozigóticos e $dy^{W/-}$ nos estádios estudados (Figura 12G-I).

Concluimos que a ausência de laminina 211 e 221 nos fetos $dy^{W/-}$ não parece afetar o padrão de distribuição de colagénio tipo IV, perlecan ou colagénio tipo VI nos estádios fetais estudados. Os valores de intensidade de fluorescência medidos também indicam que a deposição de colagénio tipo IV, perlecan e colagénio tipo VI não é diferente na ausência de laminina 211 e 221. No entanto, para confirmar este resultados, seria necessário utilizar uma técnica quantitativa mais precisa, como por exemplo Western blot.

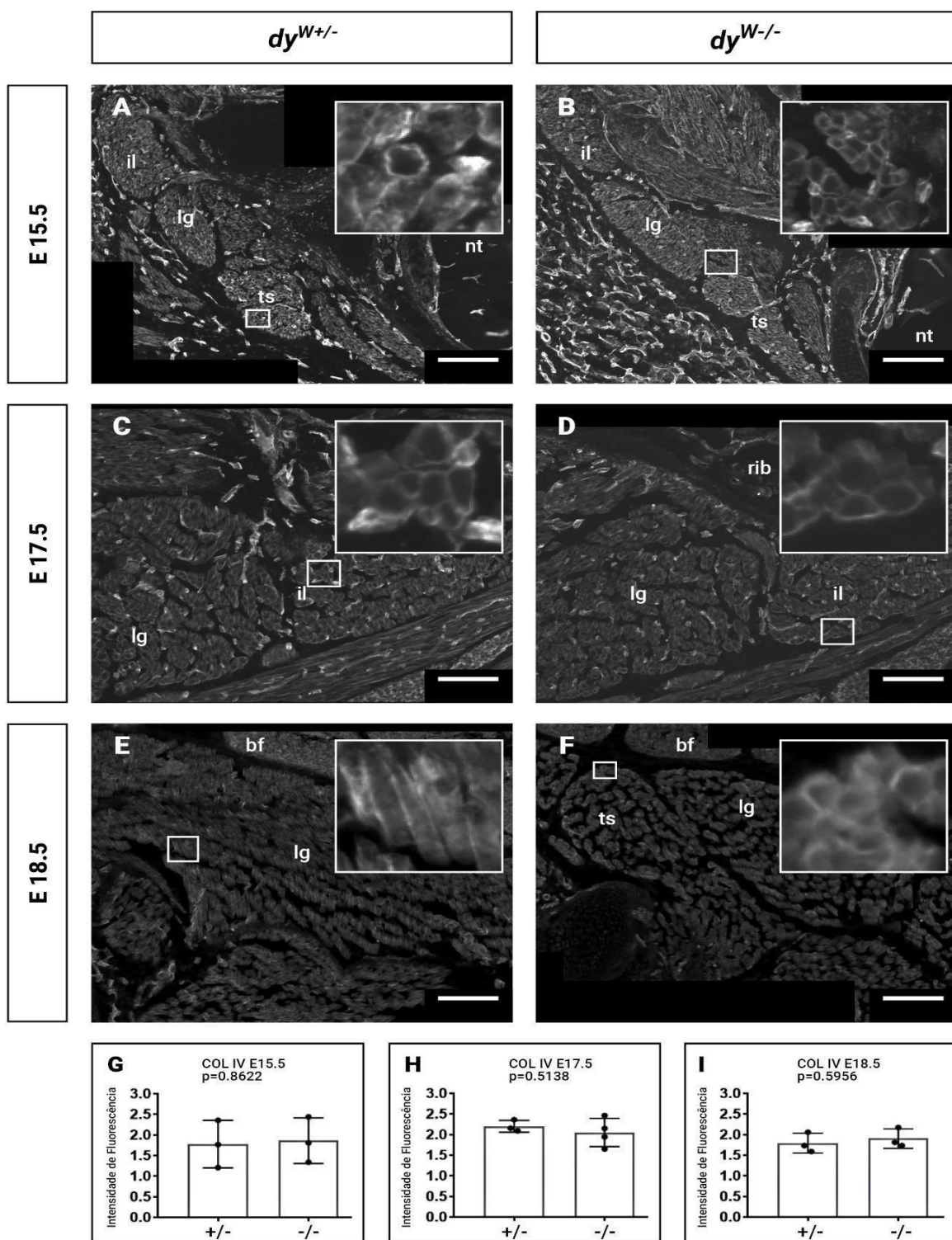


Figura 10 – A imunomarcção para colagénio tipo IV não revela diferenças entre músculos de fetos heterozigóticos versus *dy*^{W-/-}. Colagénio tipo IV em cortes transversais de fetos heterozigóticos (A,C,E) e *dy*^{W-/-} (B,D,F) ao nível do coração, nos estádios E15.5 (A e B), E17.5 (C e D) e E18.5 (E e F). Os quadrados indicam o local da ampliação nos *inserts*, onde é possível verificar em detalhe, a presença de colagénio tipo IV em redor das fibras. Não parece haver diferenças no padrão de marcação entre heterozigóticos e *dy*^{W-/-} nos estádios estudados (comparar A e B, C e D, E e F). A quantificação da intensidade de fluorecência da imunomarcção (ver Figura 9) para o colagénio tipo IV nos músculos epaxiais não revela diferenças significativas entre fetos heterozigóticos versus *dy*^{W-/-} em nenhuns dos três estádios estudados (G-I). nt=tubo neural; rib=costela; bf=gordura castanha; ts=transversospinales; lg=longissimus; il=iliocostalis; p=p value Student's test. Barra de escala em A-F: 100 µm.

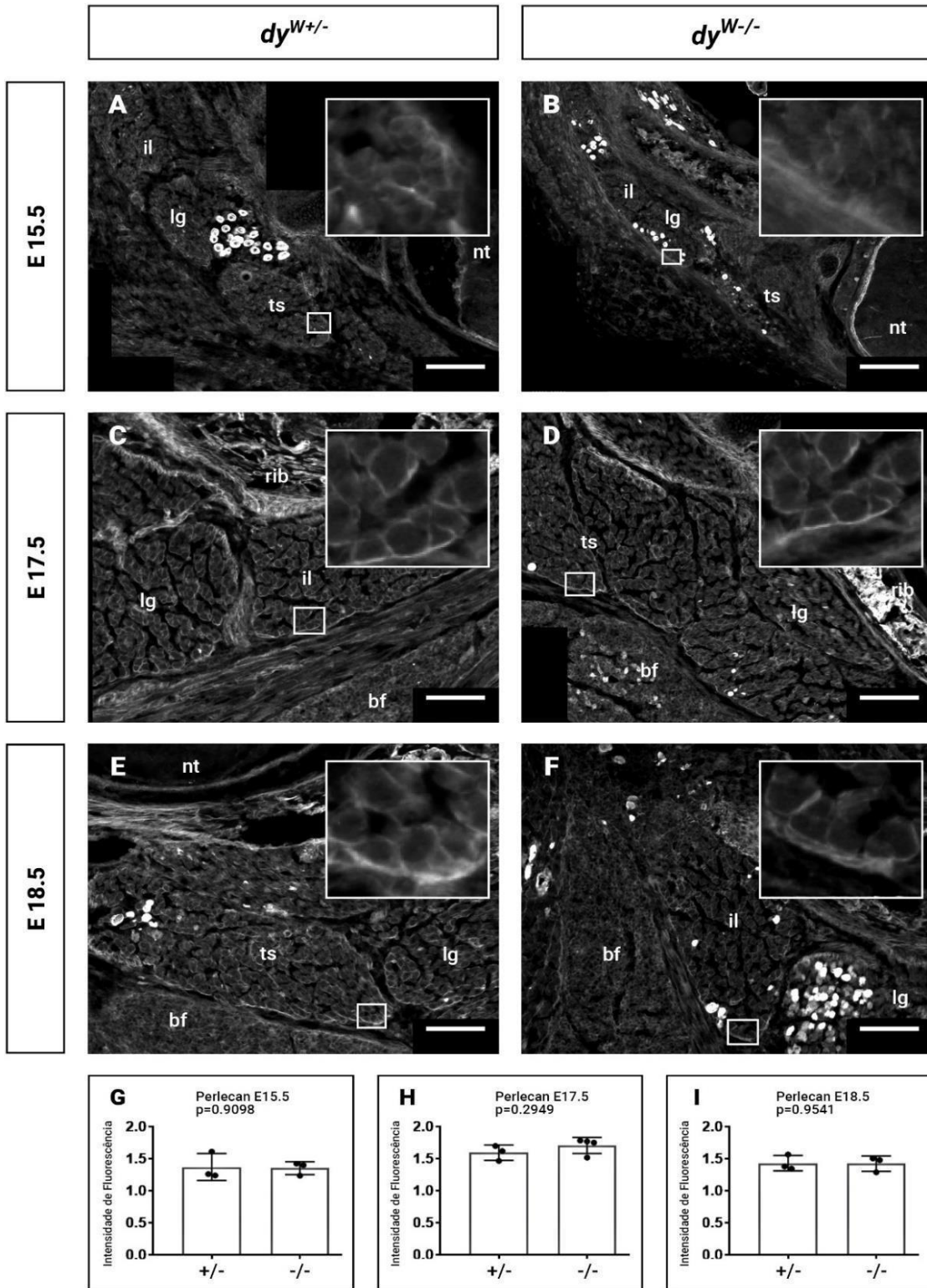


Figura 11 – A imunomarcção para perlecan não revela diferenças entre músculos de fetos heterozigóticos versus $dy^{W-/-}$. Perlecan em cortes transversais de fetos heterozigóticos (A,C,E) e $dy^{W-/-}$ (B,D,F) ao nível do coração, nos estádios E15.5 (A e B), E17.5 (C e D) e E18.5 (E e F). Os quadrados indicam o local da ampliação nos *inserts*, onde é possível verificar em detalhe, a presença de Perlecan em redor das fibras. Não parece haver diferenças no padrão da marcação entre heterozigóticos e $dy^{W-/-}$ nos estádios estudados (comparar A e B, C e D, E e F). A quantificação da intensidade de fluorescência da imunomarcção (ver Figura 9) para o Perlecan nos três músculos epaxiais não revela diferenças significativas entre fetos heterozigóticos versus $dy^{W-/-}$ em nenhuns dos três estádios estudados (G-I). nt=tubo neural; rib=costela; bf=gordura castanha; ts=transversospinales; lg=longissimus; il=iliocostalis; p=p value Student's test. Barra de escala em A-F: 100 μ m.

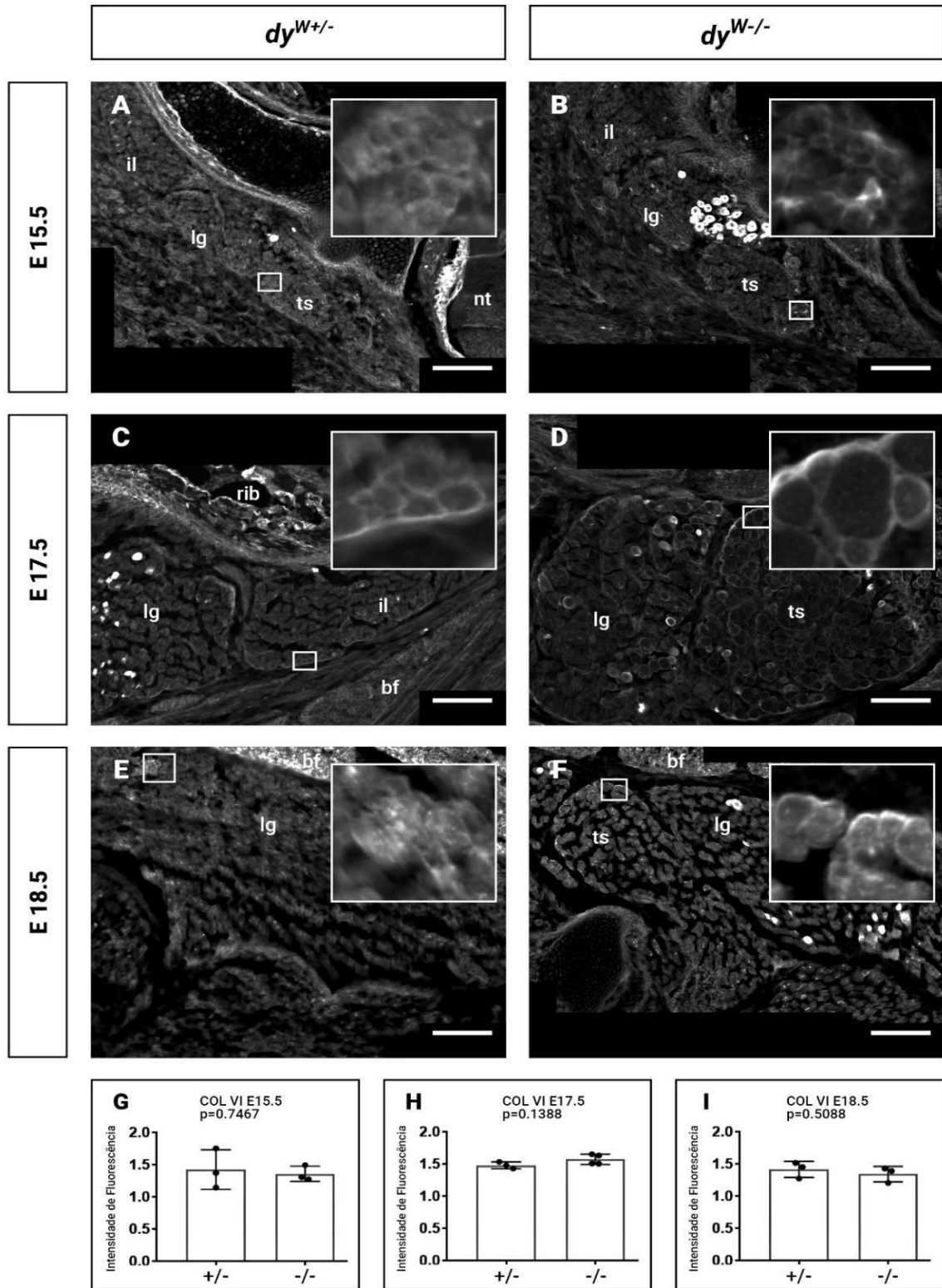


Figura 12 – A imunomarcção para colagénio tipo VI não revela diferenças entre músculos de fetos heterozigóticos versus $dy^{W-/-}$. Colagénio tipo VI em cortes transversais de fetos heterozigóticos (A,C,E) e $dy^{W-/-}$ (B,D,F) ao nível do coração, nos estádios E15.5 (A e B), E17.5 (C e D) e E18.5 (E e F). Os quadrados indicam o local da ampliação nos *inserts*, onde é possível verificar em detalhe, a presença de colagénio tipo VI no espaço entre as fibras. Não parece haver diferenças no padrão da marcação entre heterozigóticos e $dy^{W-/-}$ nos estádios estudados (comparar A e B, C e D, E e F). A quantificação da intensidade de fluoreescência da imunomarcção (ver Figura 9) para o colagénio tipo VI nos músculos epaxiais não revela diferenças significativas entre fetos heterozigóticos versus $dy^{W-/-}$ em nenhuns dos três estádios estudados (G-I). nt=tubo neural; rib=costela; bf=gordura castanha; ts=transversospinales; lg=longissimus; il=iliocostalis; p=p value Student's test. Barra de escala em A-F: 100 μ m.

A proliferação celular nas massas musculares epaxiais de fetos $dy^{W/-}$ poderá ser afectada especificamente no estágio E17.5.

O estudo de Nunes et al. (2017) identifica um defeito no crescimento muscular de fetos $dy^{W/-}$, que foi interpretado por ser devido a uma deficiente produção de mioblastos que se fundem às fibras musculares já existentes. Possíveis razões pela deficiente produção de mioblastos é um aumento na apoptose destas células ou uma falha na proliferação celular. Não foi detetada um aumento de número de células em apoptose e uma marcação para a fosfo-histona H3, um marcador de células em mitose, não revelou uma diferença entre o número de células positivas em fetos controlos versus fetos mutantes (Nunes et al., 2017). No entanto, a utilização de um marcador de mitose no músculo esquelético pode não ser um método suficientemente sensível para quantificar a proliferação celular. Aqui utilizamos a técnica de injeção de EdU em fêmeas grávidas 12 e 4 horas antes de sacrifício. Esta metodologia permite detetar todas as células que passaram pela fase S do ciclo celular durante as 12 horas entre a injeção de EdU e a fixação dos fetos (e não apenas as células em mitose no momento da fixação dos fetos), sendo assim uma técnica mais sensível do que a marcação para a fosfo-histona H3. Contabilizamos de seguida todas as células EdU-positivas em cortes transversais das massas musculares epaxiais, em fetos heterozigóticos e $dy^{W/-}$, nos estádios E15.5, E17.5 e E18.5. O número de células EdU-positivas foi de seguida dividido pela área muscular contabilizada, obtendo assim, o número de células EdU-positivas / mm^2 . O número de células EdU-positivas em massas musculares de fetos heterozigóticos e mutantes não é diferente no estágio de E15.5 (Figura 13A, A1, B, B1, G). Por outro lado, no estágio de E17.5 parece haver uma diferença no número de células EdU-positivas entre heterozigóticos e mutantes (Figura 13C, C1, D, D1, H) e, embora esta diferença não atinja significância estatística ($p=0.0541$), é indicativa de uma tendência. No entanto, a E18.5 há outra vez um número semelhante de células EdU-positivas em heterozigóticos e $dy^{W/-}$ (Fig. 13E, E1, F, F1, J; $p=0.9514$), indicando que há um re-equilíbrio do número de células EdU-positivas/ mm^2 em fetos mutantes relativamente a heterozigóticos entre E17.5 e E18.5.

Assim, estes resultados apontam para a possibilidade de haver uma menor proliferação da população de células Pax7-positivas num ponto específico da miogénese secundária, ou seja, E17.5. No entanto, é necessário aumentar o número de fetos amostrados para confirmar se estes resultados representam de facto uma diminuição na proliferação, com eventuais efeitos no crescimento das fibras musculares fetais.

O número de células Pax7-positivas em presumíveis massas musculares epaxiais de fetos $dy^{W/-}$ é afectado a partir do estágio E17.5.

No estudo de Nunes et al. (2017) foi realizada uma contabilização de células Pax7-positivas que indicou que o defeito no crescimento muscular em fetos $dy^{W/-}$ tem como base uma anormal diminuição no número de células Pax7-positivas, que ocorre no período entre os estádios de E17.5 e E18.5. Como vimos uma tendência para uma diminuição na proliferação celular em E17.5 (Figura 13I), quantificamos o número de células Pax7-positivas em cortes adjacentes aos cortes utilizados para a quantificação de células EdU-positivas para todos os estádios amostrados. Assim os resultados poderão ser relacionados ao ponto de serem analisados e discutidos como um só.

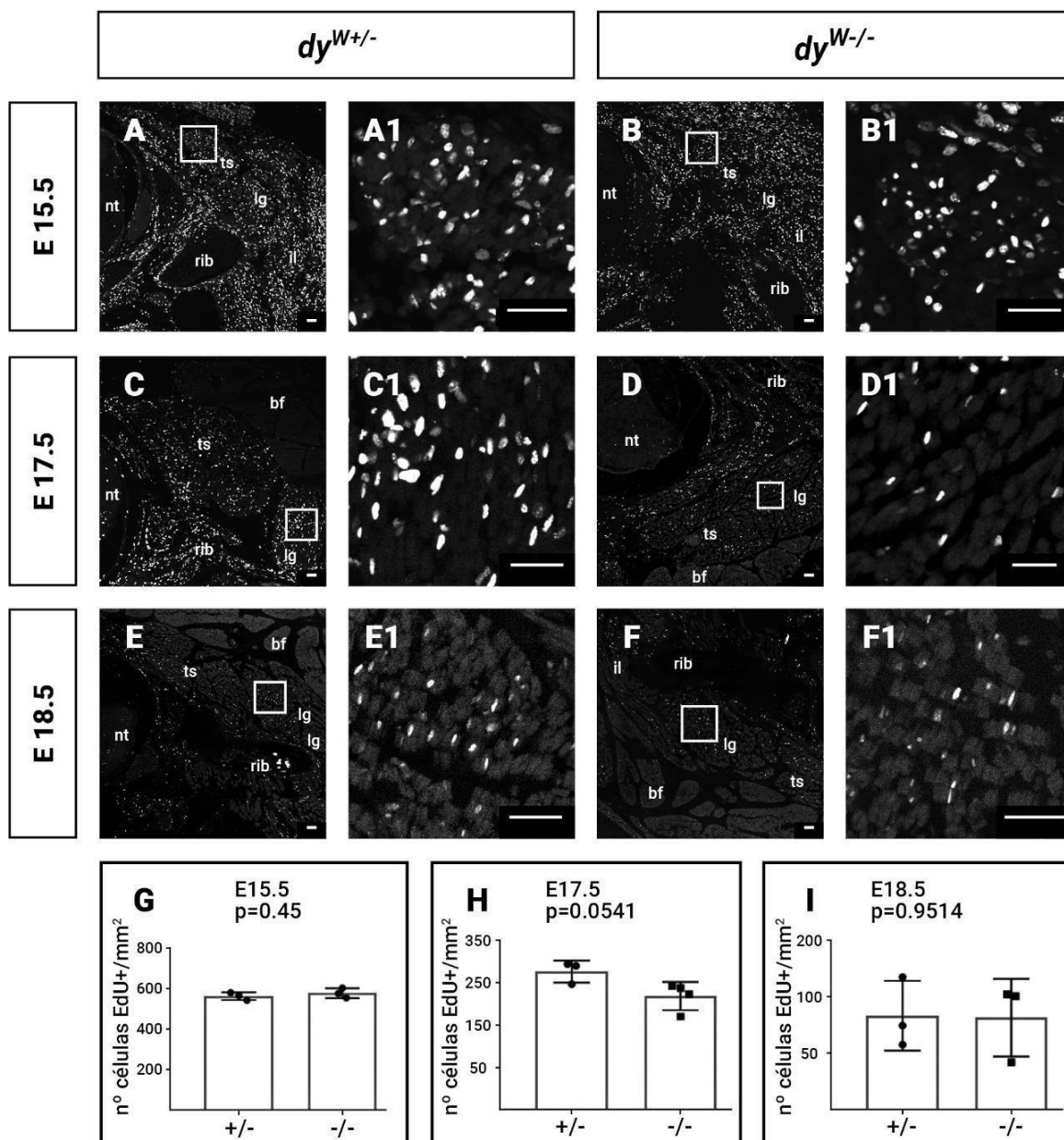


Figura 13 – Existe uma tendência para uma redução na proliferação celular em fetos $dy^{W-/-}$ comparado com heterozigóticos especificamente no estágio de E17.5. Detecção de núcleos EdU-positivos em cortes transversais de fetos heterozigóticos (A,C,E) $dy^{W-/-}$ (B,D,F), ao nível do coração, nos estádios E15.5 (A e B), E17.5 (C e D) e E18.5 (E e F), evidenciam núcleos EdU-positivos nas presumíveis massas musculares epaxiais, notando-se uma densidade grande de núcleos EdU-positivos em E15.5 que diminui progressivamente ao longo dos estádios seguintes, com o crescimento do músculo, em ambos os genótipos (A,C,E e B,D,F). Não se deteta diferenças significativas entre o número de células EdU-positivas nas massas musculares epaxiais (células/mm²) de fetos heterozigóticos versus $dy^{W-/-}$ em nenhum dos estádios estudados. No entanto, os resultados para o estágio de E17.5 demonstram que poderá haver uma menor proliferação celular em $dy^{W-/-}$ especificamente neste estágio (Comparar C,C1 com D,D1). Embora a diferença não seja estatisticamente significativa com a amostra atual, o valor de $p=0.0541$ é indicativo de uma possível tendência (H). Barra de escala em A-F: 100 μ m.

Como tal foi feita uma quantificação de células Pax7-positivas em presumíveis massas musculares epaxiais em fetos $dy^{W-/-}$ e heterozigóticos nos estádios E15.5, E17.5 e E18.5, obtendo um valor de número de células Pax7-positivas/mm². No estágio de E15.5, o número de células Pax7-positivas/mm² não difere entre heterozigóticos e $dy^{W-/-}$ (Figura 14A,A1,B,B1,G; $p=0.3112$). No entanto é observado uma redução significativa no número de células Pax7-positivas/mm² em fetos

$dy^{W/-}$ comparado com heterozigóticos no estágio de E17.5 (Figura 14C,C1,D,D1,H; $p=0.0155$) e esta diferença é acentuada no estágio de E18.5 (Figura 14E,E1,F,F1,I; $p=0.0021$).

Assim, os nossos dados mostram que há já uma diminuição significativa no número de células

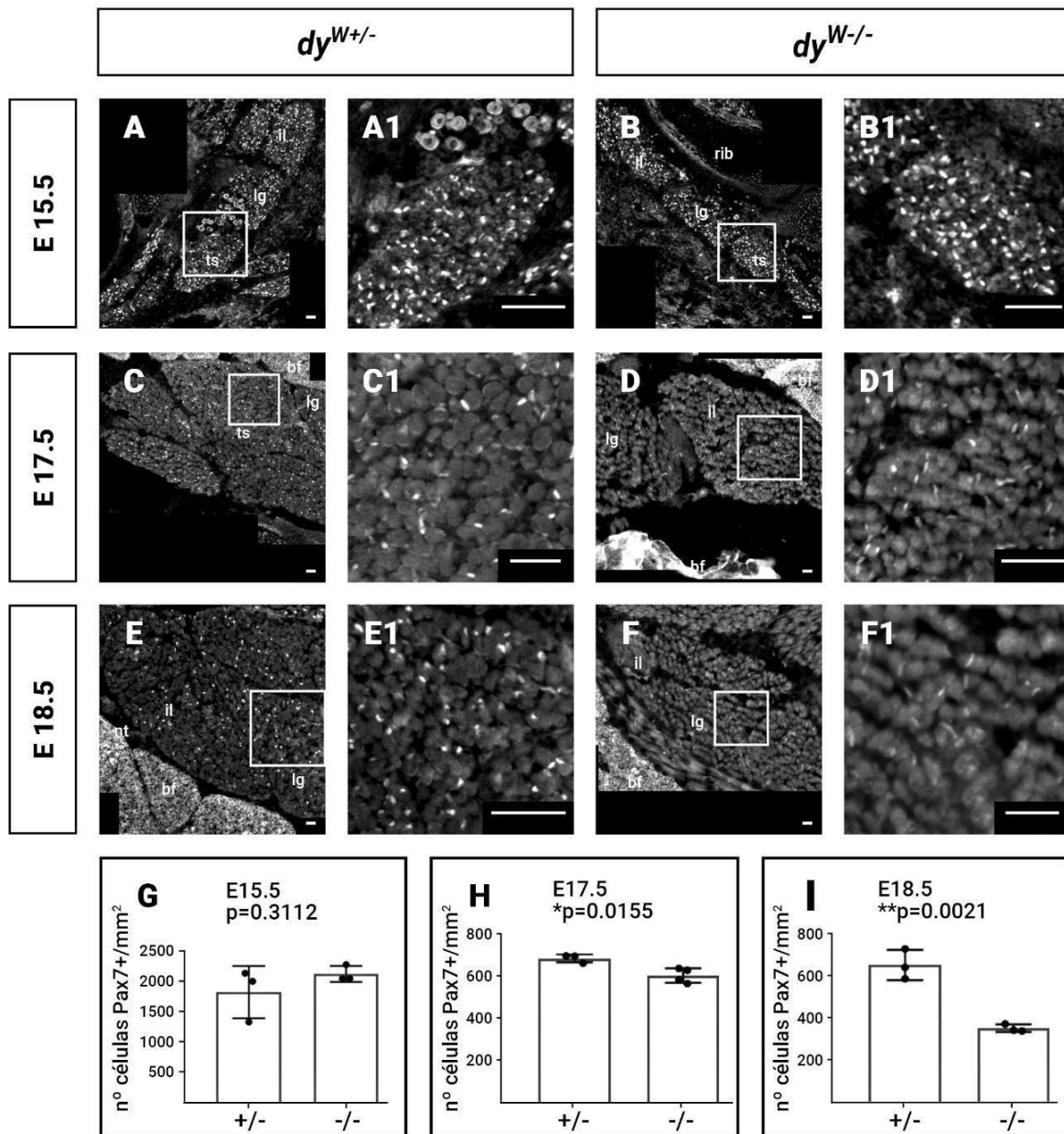


Figura 14 - Existe uma diminuição significativa de células Pax7-positivas em massas musculares epaxiais de fetos $dy^{W/-}$ a partir do estágio E17.5. Detecção de Pax7 em cortes transversais de fetos heterozigóticos (A,C,E) $dy^{W/-}$ (B,D,F), ao nível do coração, nos estádios E15.5 (A e B), E17.5 (C e D) e E18.5 (E e F), evidenciam as células Pax7-positivas nas massas musculares epaxiais. Os dados quantitativos demonstram que não há diferença entre o número de células Pax7-positivas/mm² entre fetos heterozigóticos e $dy^{W/-}$ no estágio E15.5 ($p=0.3112$) (G). No entanto, há um decréscimo significativo do número de células Pax7-positivas/mm² em fetos $dy^{W/-}$ comparado com heterozigóticos no estágio E17.5 (* $p=0.0155$) (H), tal como um acentuar desse decréscimo no estágio E18.5 (** $p=0.0021$) (I). Esta evolução do número de células Pax7-positivas/mm² ao longo da miogénese secundária em fetos $dy^{W/-}$ é ainda mais visível em (G-I) se se comparar com os valores de fetos heterozigóticos, já que nestes o decréscimo do número de células Pax7-positivas é menos acentuado de E15.5 a E17.5 e ao contrário dos fetos $dy^{W/-}$, há uma manutenção da população de células Pax7-positivas entre E17.5 e E18.5. Barra de escala em A-F: 100µm.

Pax7-positivas/mm² nos fetos $dy^{W/-}$ de E17.5 e que essa redução fica mais acentuada no estágio de E18.5.

Parece haver uma redução pontual na taxa de proliferação nas massas musculares $dy^{W/-}$ por volta do estágio de E17.5, com um efeito na população de células Pax7-positivas nesse estágio e no seguinte

As quantificações do número de células EdU -positivas e das células Pax7-positivas, nos três músculos epaxiais *longissimus*, *transversospinalis* e *iliocostalis* nos estádios E15.5, E17.5 e E18.5 efectuados neste trabalho, tinham como objectivo obter um número dessas células por mm^2 e assim, fazer uma apreciação da sua evolução ao longo dos três estádios para a mesma área, que seria a

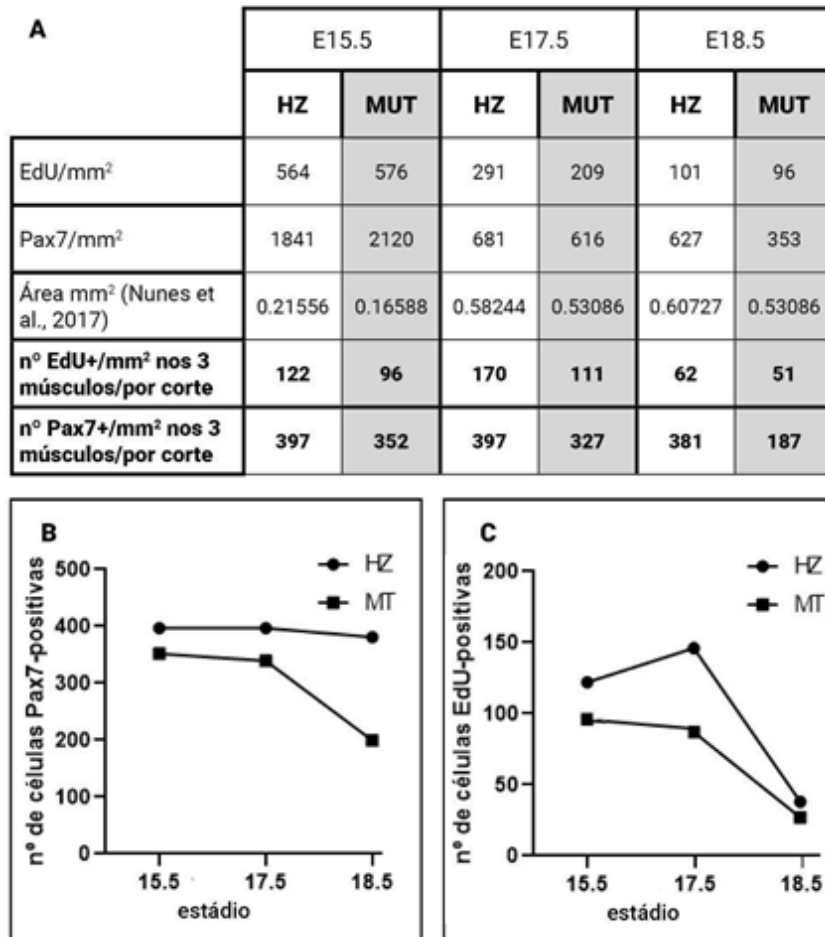


figura 15 – Normalização das quantificações de células Pax7-positivas e células EdU-positivas para a área total dos três músculos epaxiais. Tabela demonstrando a estratégia de cálculo de número de células Pax7- e EdU-positivas totais nos dos três músculos epaxiais (*longissimus*, *transversospinalis*, *iliocostalis*). Utilizou-se as quantificações de células Pax7-positivas/ mm^2 e de células EdU-positivas/ mm^2 obtidas neste trabalho e as medições da área total dos três músculos epaxiais (*longissimus*, *transversospinalis*, *iliocostalis*) obtidas por Nunes et al., 2017 (A). Visualização gráfica do número estimado de células Pax7-positivas presentes nos três músculo epaxiais revela uma redução de número de células Pax7-positivas a partir do estágio E17.5 nos mutantes comparando com heterozigóticos e verifica-se que essa redução é muito mais acentuada a E18.5 (B). Visualização gráfica do número estimado de células EdU-positivas presentes nos três músculo epaxiais revela que no estágio E15.5 para o estágio E17.5 há um aumento da taxa de proliferação nas três massas musculares epaxiais em heterozigóticos, ao contrário dos mutantes, em que é observado um ligeiro declínio. A partir de E17.5 o declínio da proliferação acontece tanto em heterozigóticos como em mutantes, de forma a que no estágio E18.5 a taxa de proliferação em heterozigóticos e mutantes é semelhante.

totalidade da área medida destes músculos. Apesar das quantificações terem sido feitas nos três músculos epaxiais e ter-se obtido um número de células por mm^2 , nem sempre foi possível medir a totalidade da área dos três músculos epaxiais, ora porque o corte saia danificado, ora porque não foi possível obter mais cortes do material biológico disponível. Assim sendo, se se quiser fazer uma apreciação da evolução do número de células Pax7-positivas e da taxa de proliferação para a totalidade da área dos três músculos epaxiais, é necessário fazer uma normalização das quantificações obtidas, ou

seja, multiplicar o número de células/ mm^2 obtido pela área total medida destes músculos. Nunes et al., 2017 mediram a área total destes músculos nos mesmos estádios e no mesmo nível axial. Sendo assim, utilizou-se as áreas medidas pelo Nunes et al., (2017) como uma boa estimativa da área real deste músculos nos estádios em estudo (Figura

15A). Como resultado final tem-se então o número de células EdU-positivas e Pax7-positivas nas massas musculares epaxiais, estimados para a totalidade da sua área (Figura 15A).

Desta forma, é possível observar que nos fetos $dy^{w/-}$ há menos células Pax7-positivas nestes músculos a E17.5. Há um declínio do número de células Pax7-positivas do estágio E17.5 para E18.5, tanto em heterozigóticos (de 681 para 627 Pax7+/mm²) como em $dy^{w/-}$ (de 616 para 353 Pax7+/mm²), mas o declínio é muito mais acentuado nos fetos $dy^{w/-}$ (Figura 15B). Também é possível observar, com esta normalização por área das quantificações de células EdU- e Pax7- positivas, que a taxa de proliferação aumenta de E15.5 para E17.5 em heterozigóticos, ao contrário do que acontece em fetos $dy^{w/-}$ onde decai ligeiramente. No entanto a taxa de proliferação em ambos os grupos baixa entre E17.5 e E18.5 e atingem um valor semelhante de taxa de proliferação no estágio E18.5 (Figura 15C).

Tendo em conta a adjacência dos cortes nas quantificações de células EdU-positivas e Pax7-positivas, é possível relacionar os dados das duas quantificações normalizadas para a área total dos três músculos epaxiais. Assim sendo, o maior declínio do número de células Pax7-positivas em ratinhos $dy^{w/-}$ relativamente a ratinhos heterozigóticos nas três massas musculares epaxiais entre os estádios E17.5 e E18.5 pode estar relacionado com a redução na taxa de proliferação em fetos $dy^{w/-}$ comparado com heterozigóticos entre E15.5 e E17.5, ou seja, a menor proliferação nesse intervalo de tempo pode ser a causa de haver menos células Pax7-positivas nos estádios de E17.5 e E18.5. No entanto para tirar conclusões definitivas, é preciso repetir estas experiências em mais fetos e medir a área, as células EdU- e Pax7-positivas nos mesmos fetos.

A ausência de laminina 211 parece afetar a proliferação tanto de células miogénicas como não miogénicas nas massas musculares epaxiais de fetos $dy^{w/-}$ no estágio E17.5

A quantificação da proliferação celular em massas musculares epaxiais no estágio E17.5 evidenciou uma tendência para uma menor proliferação/mm² nas massas musculares epaxiais em fetos $dy^{w/-}$. No entanto, como a imunomarcação nos mesmos cortes de células EdU- e Pax7-positivas não

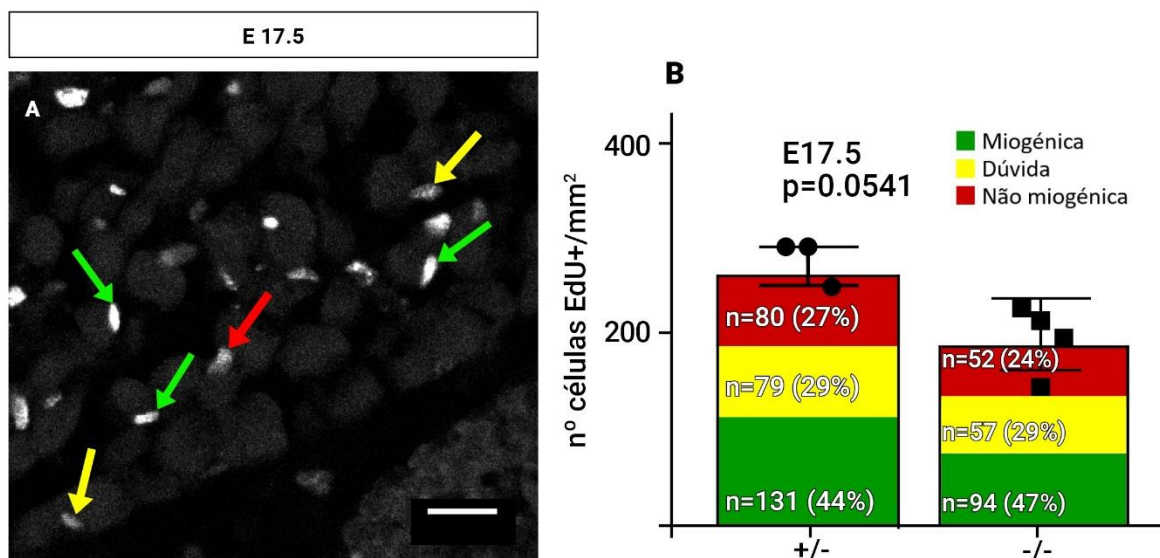


Figura 16 – A possível diminuição na proliferação celular em massas musculares epaxiais de fetos $dy^{w/-}$ comparado com heterozigóticos parece afetar tanto células miogénicas como não miogénicas. Quantificação nos cortes com marcação para células EdU-positivas no estágio E17.5, utilizando critérios morfológicos e de posição relativamente às fibras, para indentificar o tipo celular das células EdU-positivas mononucleadas. (A) As setas a verde indicam células EdU+/miogénicas, a vermelho células EdU+/não miogénicas e a amarelo células EdU+/sem uma morfologia clara. (B) Detecção de núcleos EdU-positivos em cortes transversais de fetos heterozigóticos e $dy^{w/-}$ a E17.5 divididos pelos três grupos morfológicos identificados em (A). Células EdU+/não miogénicas são 27% do total nos fetos heterozigóticos comparado com 24% nos fetos mutantes, as células EdU+/? miogénicas são 29% das células em ambos os genótipos e finalmente as células EdU+/miogénicas são 44% do total nos fetos heterozigóticos comparado com 47% nos fetos mutantes (B).

foi possível, não sabemos se há uma diferença na capacidade de proliferação de células miogénicas Pax7-positivas versus outras células mononucleadas nas massas musculares (e.g. fibroblastos, células endoteliais, pericitos etc) em fetos heterozigóticos e mutantes neste estágio. Optou-se então por fazer uma nova quantificação nos cortes com marcação para células EdU-positivas no estágio E17.5, utilizando critérios morfológicos para tentar identificar o tipo celular das células EdU-positivas. No caso da célula EdU-positiva ter uma localização e morfologia própria das células miogénicas, ou seja, achatada e adjacente a uma fibra muscular, então foi classificada como uma célula EdU+ miogénica (EdU+/miogénica; Figura 16A, setas verdes). No caso de se encontrar no espaço intersticial entre as miofibras, foi classificada como uma célula EdU+ não miogénica (EdU+/não miogénica; Figura 16A, setas vermelhas). Há ainda um terceiro grupo de células que têm uma morfologia e posição relativamente a fibra muscular que é intermédia e que não permite que seja classificada como miogénica ou não miogénica. Estas células foram incluídas numa terceira categoria, nomeadamente células EdU+, mas que não sabemos se são miogénicas ou não (EdU+/?; Figura 16A, setas amarelas).

Assim, as células EdU-positivas foram quantificadas no estágio E17.5 e cada célula EdU-positiva foi classificada numa das três categorias descritas em cima. Foi de seguida calculada a percentagem para estes três grupos. Os resultados demonstram que parece haver uma redução aproximadamente proporcional de células EdU-positivas/mm² nas três categorias de células. Células EdU+/não miogénicas são 27% do total nos fetos heterozigóticos comparado com 24% nos fetos mutantes, as células EdU+/? miogénicas são 29% das células em ambos os genótipos e finalmente as células EdU+/miogénicas são 44% do total nos fetos heterozigóticos comparado com 47% nos fetos mutantes (Figura 16B). Estes resultados apontam para uma diminuição na proliferação dos três grupos de células nos fetos mutantes, embora surpreendentemente, o efeito nas células miogénicas seja um pouco menor do que nas células não miogénicas.

A maioria das células Pax7-positivas nos fetos heterozigóticos e mutantes não têm indicação de assimetria

Um dos possíveis mecanismos por detrás do defeito no crescimento do músculo fetal nos fetos mutantes descrito pela Nunes et al. (2017) é um possível aumento na frequência de divisões assimétricas de células Pax7-positivas, gerando uma célula Pax7-positiva e um mioblasto, e uma consequente diminuição de divisões simétricas, gerando duas células Pax7-positivas (Dumond et al., 2015; Nunes et al., 2017).

Perante este cenário tentou-se desenvolver um método de imunomarcção que desse para distinguir se as células Pax7-positivas têm ou não o Par3 polarizado, utilizando essa informação como um proxy para uma eventual futura divisão assimétrica ou simétrica. Imunomarcações duplas de Pax7 e Par3 em cortes transversais de fetos dyW no estágio E17.5 evidenciaram três padrões: (1) células Pax7-positivas e Par3-positivas (Pax7+/Par3+; Figura 17A-D), no qual se deteta um núcleo Pax7-positivo e uma bainha de imunomarcção para Par3 num dos lados da célula, indicando uma assimetria; (2) células Pax7-positivas e Par3-negativas (Pax7+/Par3-; Figura 17E-H), no qual se pode ver um núcleo Pax7-positivo mas a ausência de marcação para Par3 na membrana plasmática, indicando ausência de assimetria; e (3) células Pax7-negativas e Par3-positivas (Pax7-/Par3+; Figura 17I-L), onde não há marcação para Pax7 mas há uma bainha de Par3, sugerindo uma assimetria, mas numa célula já em fase de diferenciação ou numa célula não miogénica.

Em seguida, utilizando imagens retiradas ao longo das massas musculares epaxiais a partir da imunomarcção dupla de Pax7 e Par3 dos cortes transversais de fetos de E17.5, foram contabilizados estes três padrões, numa tentativa de estabelecer uma quantificação que pudesse indicar alguma diferença entre fetos heterozigóticos e mutantes. Por exemplo, se o grupo de fetos heterozigóticos

mostrasse mais padrões Pax7+/Par3- ou o grupo de fetos $dy^{W/-}$ mostrasse ter mais padrões Pax7+/Par3+ seria possível concluir que pudesse haver mais divisões assimétricas nos mutantes. No entanto, não parece existir uma diferença entre os grupos de heterozigóticos e $dy^{W/-}$ para os três diferentes padrões da imunomarcacão dupla de Pax7 e Par3. No entanto ficou evidenciado que o padrão Pax7+/Par3- é o mais frequente tanto em fetos heterozigóticos como $dy^{W/-}$, sugerindo uma preponderância de divisões simétricas nas células Pax7-positivas em ambos os genótipos.

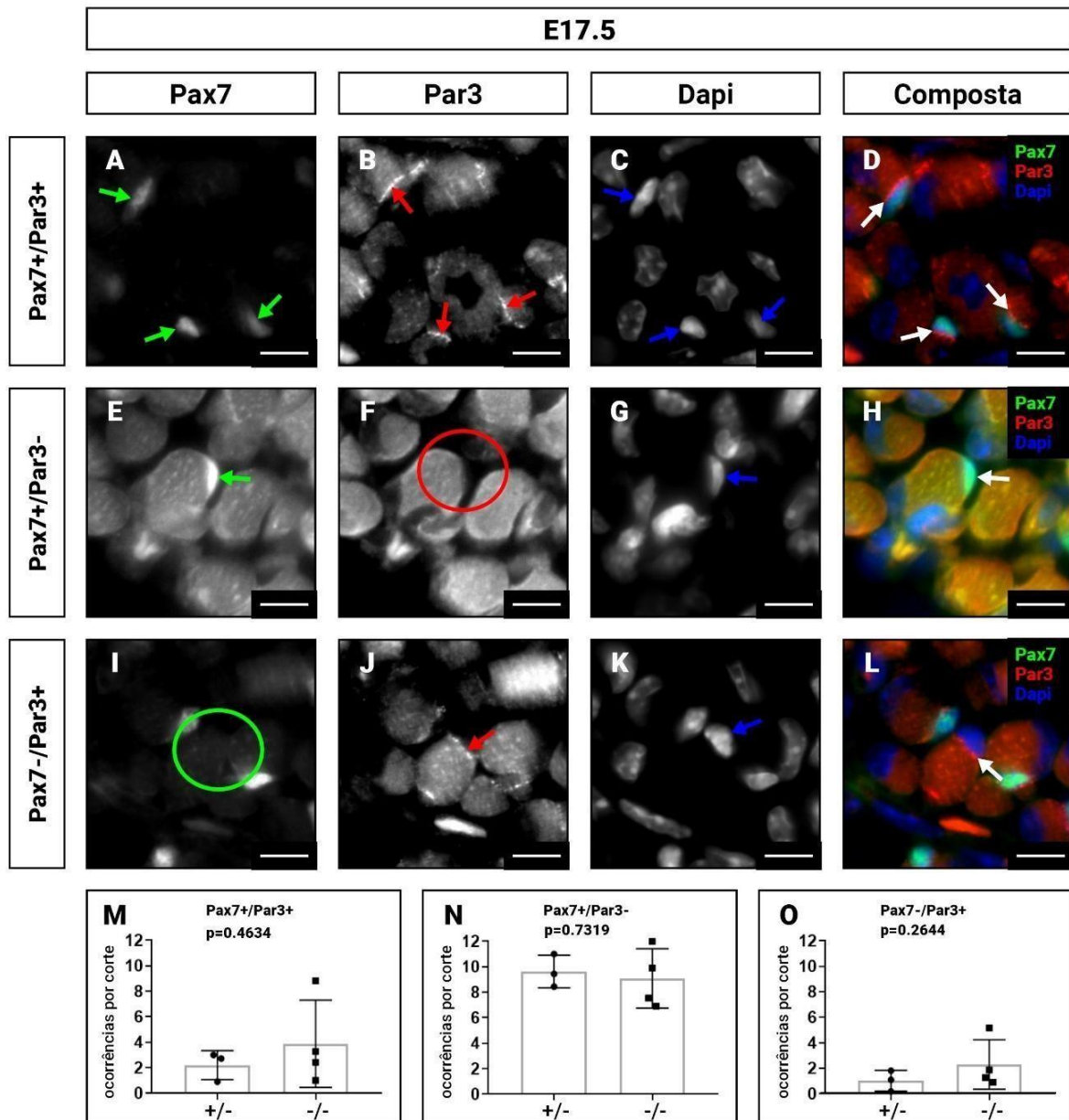


Figura 17 – Não há diferença na presença assimétrica de Par3 em células Pax7-positivas entre fetos $dy^{W/-}$ comparado com fetos heterozigóticos. Imunomarcacão dupla de Pax7 e Par3 em cortes transversais de fetos dy^W no estágio E17.5: (A,B,C,D) células Pax7-positivas e Par3-positivas (Pax7+/Par3+), no qual se deteta um núcleo Pax7- positivo e uma bainha de imunomarcacão para Par3 num dos lados da célula, indicando uma assimetria; (E,F,G,H) células Pax7-positivas e Par3-negativas (Pax7+/Par3-), no qual se pode ver um núcleo Pax7-positivo mas a ausência de marcação para Par3 na membrana plasmática, indicando ausência de assimetria; e (I,J,K,L) células Pax7-negativas e Par3-positivas (Pax7-/Par3+), onde não há marcação para Pax7 mas há uma bainha de Par3, sugerindo uma assimetria, mas numa célula já em fase de diferenciação ou numa célula não miogénica. Não parece existir uma diferença entre os grupos de heterozigóticos e $dy^{W/-}$ para os três diferentes padrões da imunomarcacão dupla de Pax7 e Par3 (M,N,O). O padrão associado às divisões simétricas é o mais frequente, independentemente do grupo. (M,N,O).

Capítulo 4

Discussão

O impacto das lamininas 211 na construção da membrana basal muscular

A polimerização e correta deposição da membrana basal muscular, em redor das miofibras e células Pax7-positivas ao longo da miogénese secundária, é iniciada com a polimerização e deposição de lamininas 211, 511 e 411 (e lamininas 221, 521 e 421 nas junções neuromusculares), ligando-se a integrina $\alpha 7\beta 1$ ou a distroglicano (Aumailley 2013; Holmberg & Durbeej 2013; Nunes et al., 2017). Tais ligações podem ter impacto na estabilização entre o citosqueleto das miofibras e a matriz extracelular e/ou da activação de vias de sobrevivência/proliferação/manutenção da estaminidade de células mononucleadas Pax7-positivas (Holmberg & Durbeej, 2013).

Neste trabalho questionou-se se a ausência específica de laminina 211 teria impacto na deposição de outros componentes da membrana basal muscular, como perlecan ou colagénio tipo IV ou se afetasse a deposição de colagénio tipo VI. As quantificações da intensidade de fluorescência das imunomarcações para colagénio tipo IV, colagénio tipo VI e perlecan não relevaram uma diferença significativa entre os grupos heterozigóticos e $dy^{W/-}$, apontando para uma independência da correta polimerização e deposição destes três componentes da matriz extracelular muscular relativamente à laminina 211.

Tendo em conta que perlecan interage diretamente com receptores transmembranares, como distroglicano ou sulfatídeos e que por sua vez o perlecan interage diretamente com a malha de colagénio tipo IV, polimerizada por cima da rede de laminina 211, pode ser que as interações descritas compensam, senão totalmente, em boa parte, a ausência de laminina 211, no que toca especificamente à deposição de perlecan, colagénio tipo IV e colagénio tipo VI (Hohenester e Yurchenco 2013). Por outro lado, também pode ser que a presença das lamininas 411 e 511 compensem a ausência de laminina 211 no que toca à deposição dos restantes componentes da membrana basal muscular, como o perlecan ou o colagénio tipo IV. A acrescentar a isto, também a agrina pode contribuir para a estabilização da malha de colagénio tipo IV, mais ou menos independente de laminina 211 (Hohenester e Yurchenco 2013).

Outro possível cenário é que a técnica utilizada para a quantificação dos três componentes da membrana basal muscular analisados não seja suficientemente sensível para detetar eventuais diferenças. Assim, para determinar se existe uma diferença na deposição de colagénio tipo IV, tipo VI e/ou perlecan durante a miogénese secundária em ratinhos $dy^{W/-}$ é imperativo utilizar a técnica de Western blot, se se quiser quantificar as proteínas, ou microscopia eletrónica de transmissão, se se quiser avaliar qualitativamente a correta organização destes componentes em redor das miofibras e células Pax7-positivas.

A ausência de laminina 211 resulta numa falha na expansão da população de células Pax7-positivas

Em Nunes et al., 2017 é relatado que há uma menor área da massa muscular de ratinhos $dy^{W/-}$ relativamente a ratinhos WT, entre os estádios E17.5 e E18.5, sendo que neste estádio a massa muscular esquelética dos primeiros equivalia a 82% da massa muscular esquelética dos segundos. Também foi relatado que essa menor área se deve a um problema no crescimento por hipertrofia mediada por células, ou seja, que há um problema no crescimento das miofibras devido a uma menor quantidade de células mononucleadas disponíveis para a fusão com as miofibras existentes (Nunes et al., 2017).

Neste sentido foi realizada uma caracterização quantitativa e qualitativa da proliferação celular nas massas musculares fetais, através da marcação de células com EdU incorporado no seu DNA e também a caracterização da dinâmica da população de células Pax7-positivas, através da imunomarcação para Pax7.

A detecção de células EdU-positivas revelou uma tendência para uma diminuição na proliferação celular em massas musculares epaxiais de ratinhos $dy^{w/-}$ relativamente a ratinhos heterozigóticos no estágio E17.5. No entanto no estágio E18.5 deixa de haver uma diferença na proliferação entre ratinhos $dy^{w/-}$ e heterozigóticos.

As células Pax7-positivas começam a ser envolvidas pela membrana basal muscular a partir do estágio E16.5 (Kassar-Duchossoy et al., 2005; Nunes et al., 2017). Tendo em conta que as lamininas 211, ligadas à integrina $\alpha7\beta1$, podem promover a proliferação de células miogénicas (Burkin & Kaufman, 1999), pode ser que a proliferação celular nos músculos fetais seja afetada logo após E16.5. Assim, seria esperado um efeito na proliferação logo após o estágio E16.5 tal como observamos no estágio de E17.5. Este efeito acontece apesar da presença das lamininas 411 e 511 em associação com células Pax7-positivas ao longo da miogénese secundária, sugerindo que essas duas lamininas não têm a capacidade de compensar pela ausência de laminina 211 em fetos $dy^{w/-}$ relativamente a WT (Nunes et al., 2017). A não compensação de lamininas 411 por lamininas 211 pode ser explicada pela fraca ligação que a laminina 411 tem com distroglicano e integrinas $\alpha7\beta1$, ausência de receptores transmembranares alternativos e à incapacidade desta laminina para a auto- polimerização (Talts et al., 2000, Nishiuchi et al 2005, McKee et al 2017). Já no caso da laminina 511, apesar de se associar bem a várias integrinas, tais como a $\alpha7\beta1$ e de ter capacidade de auto- polimerização, tem uma fraca associação com distroglicano se for comparada com a laminina 211 (Yu and Talts 2003, Nishiuchi et al 2005, McKee et al 2017).

Um outro dado que os nossos resultados apontam, é que no estágio de E18.5, a proliferação celular em massas musculares epaxiais dos ratinhos $dy^{w/-}$ voltar ao normal relativamente a ratinhos heterozigóticos no estágio E18.5. Surge a pergunta de como ocorre essa recuperação visto que as células miogénicas continuam a estarem envolvidas pela membrana basal nesta fase. Uma possível explicação poderá envolver a mudança de identidade das células miogénicas ao longo do desenvolvimento muscular (Tierney et al., 2016). As células miogénicas fetais caracterizam-se por terem uma capacidade grande de proliferação, característica essa que perdem progressivamente nos estádios pós-natais a favor de uma capacidade de entrar em quiescência (Tierney et al., 2016). Assim, é possível que a população de células mononucleadas musculares no estágio E17.5 tenha uma capacidade proliferativa maior do que a mesma população no estágio E18.5 e assim por diante ao longo do desenvolvimento (Tierney et al., 2016). Portanto, partindo do pressuposto que um defeito na proliferação da população de células Pax7-positivas tenha um impacto importante na proliferação total das massas musculares epaxiais, existe um reaproximar das taxas de proliferação no estágio E18.5 após uma tendência para um desequilíbrio a E17.5, como se as células Pax7-positivas nos ratinhos $dy^{w/-}$ atingissem a identidade de E18.5 mais cedo do que as mesmas células nos ratinhos heterozigóticos.

A par de uma tendência para uma redução na proliferação celular em massas musculares no estágio E17.5 em ratinhos $dy^{w/-}$, foi quantificado o número de células Pax7-positivas em ratinhos $dy^{w/-}$ relativamente a heterozigóticos. Os dados mostram um número significativamente menor nos fetos $dy^{w/-}$ a partir do estágio E17.5, sendo que essa diferença se acentua no estágio E18.5. Como já foi dito, as células Pax7-positivas começam a ser envolvidas pela membrana basal muscular a partir do estágio E16.5 (Kassar-Duchossoy et al., 2005; Nunes et al., 2017). Ao longo da miogénese secundária, a população de células Pax7-positivas cresce entre E14.5 e E17.5, estabiliza entre E17.5 e E18.5, e diminui entre E18.5 e P2 (Nunes et al., 2017). Esta dinâmica poderá ser importante para gerar células suficientes para o crescimento da musculatura esquelética e para, ao mesmo tempo, manter uma população de células estaminais mononucleadas com potencial regenerador ao longo da fase adulta, ou seja, as células satélite (Biressi et al., 2007; Tajbakhsh, 2009). Assim sendo, se se fizer um paralelismo, no estágio E17.5, da população de células Pax7-positivas em heterozigóticos e da mesma população em ratinhos $dy^{w/-}$, com menos células relativamente à primeira, a acentuação da redução

significativa entre as duas populações no estágio E18.5 pode ser explicada por ambas terem partido de pontos diferentes no que toca à sua dimensão. Quer isto dizer, que estando as duas populações de células a proliferar, se uma tem menos células, acabará por ter um potencial reduzido de manter um número adequado para o normal desenvolvimento da musculatura esquelética.

Idealmente, a caracterização da dinâmica da população de células Pax7-positivas passaria por uma quantificação do número destas células que estivessem a proliferar, em cortes que permitissem uma fiel contabilização da área total, de forma a poder calcular uma taxa de proliferação das células Pax7-positivas em massas musculares epaxiais, ao longo da miogénese secundária. Tal não foi possível porque a técnica de *antigen retrieval*, necessária para a deteção de Pax7 por imunohistoquímica, interfere com a reação Click-it do kit de EdU. Por isso, foi implementada uma metodologia no qual os cortes para as quantificações da proliferação em massas musculares epaxiais fossem adjacentes aos cortes utilizados para as quantificações das células Pax7-positivas. Desta forma há a possibilidade de relacionar as duas quantificações. Por outro lado, as duas quantificações foram normalizadas com as medições da área total das massas musculares epaxiais ao longo da miogénese secundária (E15.5, E17.5, E18.5) em Nunes et al., 2017, obtendo assim uma estimativa das quantificações para as áreas totais.

Assim, é possível construir um possível cenário que possa explicar o defeito da musculatura epaxial em ratinhos $dy^{w/-}$, entre E17.5 e E18.5, descrito em Nunes et al., 2017. A partir de E16.5, a membrana basal muscular começa a envolver a maioria das células Pax7-positivas adjacentes às fibras musculares, criando assim o seu nicho próprio. No entanto, em ratinhos $dy^{w/-}$, esse nicho vê-se privado de laminina 211, sem um efeito compensador pela presença das lamininas 411 e 511. Tendo em conta que a laminina 211 pode transmitir sinais de proliferação (Burkin & Kaufman, 1999), poderá haver uma tendência para um defeito na proliferação que se manifesta num número de células Pax7-positivas significativamente menor no estágio E17.5. O número reduzido de células Pax7-positivas em ratinhos $dy^{w/-}$ relativamente à mesma população em heterozigóticos, revela-se com um potencial menor para crescer e manter assim o normal desenvolvimento muscular esquelético, pelo que há uma acentuação dessa perda no estágio E18.5. Por tudo isto, a tendência para um defeito pontual (E17.5) na proliferação celular parece levar a um acentuar da redução na população de células Pax7-positivas entre o estágio de E17.5 e E18.5.

Impacto da laminina 211 na proliferação em massas musculares epaxiais: Um problema exclusivamente miogénico?

Numa tentativa de melhor relacionar os dados da proliferação com células miogénicas no estágio E17.5, tentou-se uma abordagem envolvendo a classificação das células EdU-positivas em três categorias, com base na sua proximidade às fibras musculares (ver Resultados). Dos três grupos criados e quantificados, tendo em conta esse critério, tanto células miogénicas, como não miogénicas, como células de identidade inconclusiva sofreram o impacto da ausência de laminina 211. Este resultado remete-nos para a possibilidade da ausência da laminina 211 induzir um problema que envolva mais tipos celulares para além das células miogénicas, já que tanto células miogénicas como não miogénicas parecem ter os níveis de proliferação afetados.

Como já foi referido, tanto miofibras como células Pax7-positivas são envolvidas pela membrana basal muscular (Kassar-Duchossoy et al., 2005; Nunes et al., 2017). Assim é possível que haja um defeito na proliferação a partir da entrada das células Pax7-positivas no seu nicho à E16.5 (Kassar-Duchossoy et al., 2005), devido a um evento de sinalização envolvendo a laminina 211 e a sua interação com a integrina $\alpha7\beta1$ e/ou com distroglicano (Holmberg & Durbeek, 2013). No entanto, não são só as células mononucleadas musculares que expressam estes dois receptores transmembranares, também as miofibras os expressam (Rahimov & kunkel, 2013), pelo que a

ausência da laminina 211 pode afetar também as miofibras. As massas musculares em ratinhos $dy^{w/-}$ apresentam uma sobreativação da via de sinalização JAK-STAT (Nunes et al., 2017). Por outro lado o envelhecimento muscular em adultos, ou seja, miofibras em stress e menor capacidade regenerativa está associado a uma maior ativação da via JAK-STAT (Doles & Olwin, 2014). Também em tecido muscular cardíaco, existe uma associação entre stress dos cardiomiócitos e maior ativação da via JAK-STAT. Assim, num cenário em que as miofibras estejam em stress pela ausência de interação com a laminina 211, pode haver a ativação de respostas de stress que induzem um problema generalizado no músculo, a ponto de afetar a proliferação tanto de células miogénicas como não miogénicas.

A localização do Par-complex pode indicar o tipo de simetria das células Pax7-positivas ao longo da miogénese secundária

Neste trabalho propusemo-nos à caracterização da dinâmica de divisões celulares da população de células Pax7-positivas. Essa caracterização tem duas dimensões: - uma quantitativa através das contagens de células Pax7-positivas proliferativas; - uma qualitativa através da avaliação da simetria de divisão celular. Para essa última, foi experimentado a localização do Par3, componente do Par-complex, como proxy para a simetria das divisões de células Pax7-positivas, e foram achados três padrões principais: - as células Pax7+/Par3+ (divisão assimétrica); - as células Pax7+/Par3- (divisão simétrica); - as células Pax7-/Par3+ (divisão assimétrica mas não de célula Pax7-positiva). No que toca a frequência de cada padrão, não detetamos diferença significativa entre fetos heterozigóticos e $dy^{w/-}$ no estágio estudado (E17.5). No entanto, constatamos que dos três padrões quantificados, as divisões simétricas foram as mais abundantes. Esta observação está de acordo com estudos anteriores que sugerem que, tendo em conta que uma divisão simétrica resulta na geração de duas células filhas iguais, ou seja, aumento da população, é expectável que na fase fetais haja mais divisões simétricas, pois a população de células Pax7-positivas tem que aumentar o suficiente para poder contribuir para o crescimento muscular via hipertrofia, mas também para a geração de uma população de células satélite com poder regenerador ao longo da vida do indivíduo (Kuang et al., 2007; Dumont et al., 2015; Tierney et al., 2016; Nunes et al., 2017).

Quando uma célula Pax7-positiva se prepara para se dividir assimetricamente, o Par-complex, que noutra situação estaria disperso pelo citoplasma, ancora-se na porção intracelular da membrana plasmática que é adjacente à membrana plasmática da miofibra (Troy et al., 2012; Wang et al., 2013; Dumont et al., 2015; Rayagiri et al., 2018). Uma vez ancorado, o Par-complex interage com o fuso mitótico, ao ponto de o orientar perpendicularmente relativamente à miofibra, promovendo desta forma a divisão assimétrica (Troy et al., 2012; Wang et al., 2013; Dumont et al., 2015; Rayagiri et al., 2018). Assim, a imonumeração para Par3, conjugada com a imunomarcagem para Pax7, parece permitir marcar todas as células Pax7-positivas que se estão a dividir assimetricamente sendo este um proxy válido de acesso à simetria de divisões das células Pax7-positivas.

Desta forma, podemos concluir que a abordagem seguida pode ser útil para uma análise qualitativa do tipo de divisões das células Pax7-positivas ao longo da miogénese secundária. Poderá assim ser extendida para mais estádios e mais amostragem por estágio do que foi usada neste trabalho.

Conclusão

Ao longo deste trabalho, foi proposto um cenário que contribui para caracterizar melhor o defeito na miogénese fetal observado em ratinhos com MDC1A (Nunes et al., 2017). Com os resultados obtidos e apoiados na bibliografia, é sugerido que o defeito se deve a um problema pontual

(E17.5) na proliferação celular nas massas musculares, que leva a uma redução drástica no número de células Pax7-positivas no fim da miogénese fetal, ao ponto de não serem células suficientes que possibilitem o crescimento normal da massa muscular. A quantificação precisa do número de células Pax7-positivas proliferativas ao longo da miogénese secundária, tal como a extensão da análise da frequência dos tipos diferentes de divisões a mais estádios, poderá permitir estabelecer em melhor detalhe como a interação com os nichos fetais laminina 211-deficientes afetam, diretamente ou indiretamente, a dinâmica e a natureza das divisões das células Pax7-positivas e, consequentemente, a geração da doença.

Capítulo 6

Referências

Referências

- Allamand and V., Guicheney, P.** (2002) Merosin-deficient muscular dystrophy, autosomal recessive (MDC1A, MIM#156225, LAMA2 gene coding for $\alpha 2$ chain of laminin). *Eur. J. Hum. Genet.* **10**, 91-94.
- Aumailley, M.** (2013) The laminin family. *Cell Adh. Migr.* **7**, 48-55.
- Bajanca, F., Luz, M., Duxson, M.J. and Thorsteinsdóttir, S.** (2004) Integrins in the mouse myotome: developmental changes and differences between the epaxial and hypaxial lineage. *Dev. Dyn.* **231**, 402-415.
- Balasubramanian and R., Zhang, X.** (2016) Mechanisms of FGF gradient formation during embryogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* **53**,94-100.
- Biressi, S., Molinaro, M. and Cossu, G.** (2007) Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Dev. Biol.* **308**, 281-293.
- Brent, A.E. and Tabin, C.J.** (2002) Developmental regulation of somites derivatives: muscle, cartilage and tendon. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 548-557.
- Buckingham, M. and Rigby, P.W.J.** (2014) Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Dev. Cell*, **28**, 225-238.
- Burkin, D.J. and Kaufman, S.J.** (1999) The $\alpha 7\beta 1$ integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res.* **296**, 183–190.
- Carmignac, V. and Durbeej, M.** (2012) Cell-matrix interactions in muscle disease. *J Pathol.* **226(2)**, 200-218.
- Chargé, S. B. P. and Rudnicki, M. A.** (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* **84**, 209-238.
- Deries M*., Gonçalves A.B.* and Thorsteinsdóttir S.** (*in press*). Skeletal muscle development - from stem cells to body movement. In G. Rodrigues & B.A.J. Roelen (Eds). Springer Learning Series: “*Concepts and Applications of Stem Cell Biology: a Guide for Students*”. (*equal contribution)
- Deries, M., Schweitzer, R. and Duxson, M.J.** (2010) Developmental fate of the mammalian myotome. *Dev. Dyn.* **239**, 2898-2910.
- Deries, M. and Thorsteindóttir, S.** (2016) Axial and limb muscle development: dialogue with the neighbourhood. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 4415-4431.
- Doles, JD. and Olwin, BB.** (2014) The impact of JAK-STAT signaling on muscle regeneration. *Nat. Med.* **20(10)**, 1094-1095.
- Dumont, N. A., Wang, Y. X. and Rudnicki, M. A.** (2015) Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development.* **142**, 1572-1581.
- Dunglison, G. F., Scotting, P. J., and Wigmore, P. M.** (1999) Rat embryonic myoblasts are restricted to forming primary fibers while later myogenic populations are pluripotent. *Mech. Dev.* **87**, 11-19.

- Duxson, M.J., Usson, Y., and Harris A.J.** (1989) The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: Ultrastructural studies. *Development*. **107**, 743-750.
- Evans D., Baillie H., Caswell A. and Wigmore P.** (1994) During fetal muscle development, clones of cells contribute to both primary and secondary fibers. *Dev. Biol.* **162** (2), 348–353.
- Gawlik, K.I. and Durbeej, M.** (2011) Skeletal muscle laminin and MDC1A: pathogenesis and treatment strategies. *Skelet. Muscle*. **1**, 9.
- Han, R., Kanagawa, M., Yoshida-Moriguchi, T., Rader, E. P., Ng, R. A. and Michele, D. E.** (2009) Basal lamina strengthens cell membrane integrity via the laminin G domain-binding motif of α -dystroglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **106**, 12573-12579.
- Hohenester, E. and Yurchenco, P.D.** (2013) Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adh. Migr.* **7**, 56-63.
- Holmberg, J. and Durbeej, M.** (2013) Laminin-211 in skeletal muscle function. *Cell Adh Migr.* **7**, 111-121.
- Kalchauer, C.** (2015) Epithelial-Mesenchymal Transitions during Neural Crest and Somite Development. *J. Clin. Med.* **5**, 1; doi:10.3390/jcm5010001
- Kassar-Duchossoy, L., Giacone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomès, D. and Tajbakhsh, S.** (2005) Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* **19**, 1426-1431.
- Kuang, S., Gillespie, M. A. and Rudnicki, M. A.** (2008) Niche Regulation of Muscle Satellite Cell Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell*. **2**, 22–31.
- Kuang, W., Xu, H., Vachon, P. H., Liu, L., Loechel, F., Wewer, U. M. and Engvall, E.** (1998) Merosin-deficient Congenital Muscular Dystrophy. *The American Society for Clinical Investigation, Inc.* Vol. 102, **4**, 844-852.7
- Lampe, A.K. and Bushby, K.M.** (2005) Collagen VI related muscle disorders. *J Med Genet.* **42(9)**, 673-685.
- Lander, A. D., Kimble, J., Clevers, H., Fuchs, E., Montarras, D., Buckingham, M., Calof, A. L., Trumpp, A. and Oskarsson, T.** (2012) What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC Biology*. **10**:19.
- McCaffrey LM, Montalbano J, Mihai C. and Macara IG.** (2012) Loss of the Par3 polarity protein promotes breast tumorigenesis and metastasis. *Cancer Cell*. **22**, 601–614. [PubMed: 23153534].
- McKee, K.K., Crosson, S.C., Meinen, S., Reinhard, J.R., Ruegg, M.A. and Yurchenco, P.D.** (2017) Chimeric protein repair of laminin polymerization ameliorates muscular dystrophy phenotype. *J. Clin. Invest.* **127(3)**, 1075-1089.
- Nishiuchi, R., Takagi, J., Hayashi, M., Ido, H., Yagi, Y., Sanzen, N., Tsuji, T., Yamada, M. and Sekiguchi, K.** (2006) Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant α 3 β 1, α 6 β 1, α 7 β 1 and α 6 β 4 integrins. *Matrix Biol.* **25(3)**, 189-197.

- Nunes, A. M., Wuebbles R. D., Sarathy A., Fontelonga T. M., Deries M., Burkin D.J. and Thorsteinsdóttir S.** (2017) Impaired fetal muscle development and JAK-STAT activation mark disease onset and progression in a mouse model for merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 2018–2033.
- Ontell, M. and Kozeka, K.** (1984) Organogenesis of the mouse extensor digitorum logus muscle: a quantitative study. *Am. J. Anat.* **171**, 149–161.
- Pourquié, O.** (2001) Vertebrate somitogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 311–350.
- Price, F.D., von Maltzahn, J., Bentzinger, C.F., Dumont, N., Yin, H., Chang, N.C., Wilson, D.H., Frenette, J. and Rudnicki, M.** (2014) Inhibition of JAK-STAT signalling stimulates adult satellite cell function. *Nat. Med.* **20**, 1174–1181.
- Rahimov, F. and Kunkel, L. M.** (2013) Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* Vol. 201, **4**, 499–510.
- Rayagiri, S.S., Ranaldi, D., Raven, A., Azhar, N.I.F.M., Lefebvre, O., Zammit, P.S. and Borycki, A.** (2018) Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. *Nature communications.* **9**:1075.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A. and Buckingham, M.** (2005) A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature.* **435**, 948–953.
- Rios, A., Serralbo, O., Salgado, D. and Marcelle, C.** (2011) Neural crest regulates myogenesis through the transiente activation of NOTCH. *Nature.* **473**, 532–536.
- Rudnicki, M. A., Le Grand, F., McKinnell, I. and Kuang, S.** (2008) The Molecular Regulation of Muscle Stem Cell Function. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* Vol. **LXXIII**, 323–331
- Salic, A. and Mitchison, T.J.** (2008) A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **105**(7), 2415–2420.
- Sarrazin, S., Lamanna, WC. and Esko, JD.** (2012) Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **3**(7). pii: a004952
- Serralbo, O. and Marcelle, C.** (2014) Migrating cells mediate long-range WNT signaling. *Development.* **141**, 2057–2063.
- Suzuki, Y., Nakagawa, M. and Takeda, S.** (2000) Merosin and Congenital Muscular Dystrophy. *Microscopy Research and Technique.* **48**, 181–191.
- Tajbakhsh, S.** (2009) Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J. Intern. Med.* **266**, 372–389.
- Talts, J. F., Sasaki, T., Miosge, N., Gohring, W., Mann, K., Mayne, R. and Timpl, R.** (2000) Structural and Functional Analysis of the Recombinant G Domain of the Laminin $\alpha 4$ Chain and Its Proteolytic Processing in Tissues. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. **275**, **45**, 35192–35199.
- Thorsteinsdóttir, S., Deries, M., Cachão, A.S. and Bajanca, F.** (2011) The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. *Dev. Biol.* **354**, 191–207.

- Tierney, M.T., Aydogdu, T., Sala, D., Malecova, B., Gatto, S., Puri, P.L., Latella, L. and Sacco, A.** (2014) STAT3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal muscle repair. *Nat. Med.* **20**, 1182–1186.
- Tierney, M.T., Gromova, A., Sesillo, F.B., Sala, D., Spenlé, C., Orend, G. and Sacco, A.** (2016) Autonomous extracellular matrix remodeling controls a progressive adaptation in muscle stem cell regenerative capacity during development. *Cell Rep.* **14**, 1940-1952.
- Tomé, F., Evangelista, T., Leclerc, A., Sunada, Y., Manole, E., Estourmet, B., Barois, A., Campbell, K. and Fardeau, M.** (1994) Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *Life sciences.* **7**, 317–351.
- Troy, A., Cadwallader, AB., Fedorov, Y., Tyner, K., Tanaka, KK. and Olwin, BB.** (2012) Coordination of satellite cell activation and self-renewal by Par-complex-dependent asymmetric activation of p38 α / β MAPK. *Cell Stem Cell.* **11**(4), 541-553.
- Venters, S., Thorsteinsdóttir, S. and Duxson, M.** (1999) Early development of the myotome in the mouse. *Developmental Dynamics.* **216**, 219-232.
- Wang, Y.X., Bentzinger C.F. and Rudnicki, M.A.** (2013) Molecular regulation of determination in asymmetrically dividing muscle stem cells. *Cell Cycle.* **12**,3-4.
- Yu, H. and Talts, JF.** (2003) Beta1 integrin and alfa-dystroglycan binding sites are localized to diferente laminin-G-domain-like (LG) modules within the laminin alpha5 chain G domain. *Biochem J.* **371**(Pt 2), 289-299.
- Yurchenco, P.D.** (2011) Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004911.